



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROFIL MASTNÝCH KYSELIN SÝRŮ EIDAMSKÉHO TYPU

PROFILE OF FATTY ACIDS IN EDAM TYPE CHEESE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Hajtmarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1432/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Lucie Hajtmarová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Profil mastných kyselin sýrů eidamského typu

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - stručná charakteristika sýrů eidamského typu – složení, vlastnosti, technologie výroby
 - lipidy – charakteristika, lipidy v sýrech
 - mastné kyseliny – charakteristika, mastné kyseliny v sýrech
 - plynová chromatografie s plameno-ionizační detekcí (GC–FID) – princip, popis, instrumentace
2. Pomocí metody GC–FID identifikujte a kvantifikujte mastné kyseliny ve vzorcích sýrů
3. Porovnejte obsah a složení mastných kyselin v jednotlivých vzorcích

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lucie Hajtmarová
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací a kvantifikací volných a vázaných mastných kyselin v sýrech eidamského typu, které byly vyrobeny na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

Teoretická část se zabývá charakterizací sýrů, jejich rozdělením, složením a postupem jejich výroby. Dále obsahuje charakterizaci tuku a mastných kyselin, a také popis plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

V experimentální části byl stanoven a porovnán obsah volných a vázaných mastných kyselin v modelových vzorcích sýrů, vyrobených s použitím různých kombinací mikrobiálních kultur. Pro extrakci lipidů ze vzorku byla použita metoda podle ČSN EN ISO 1735:2005. Mastné kyseliny byly převedeny na methylestery kyselou esterifikací s methanolickým roztokem bortrifluoridu jako katalyzátoru a stanoveny plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem.

Ve vzorcích bylo stanoveno celkem 17 mastných kyselin jak ve volné, tak ve vázané formě. Jednoznačný vliv přídavku termofilní kultury na obsah mastných kyselin ve vzorcích se nepodařilo prokázat.

Summary

This bachelors thesis is focused on identification and qualification of free and bound fatty acids in edam type cheese. The samples were produced in University of Tomáš Bata in Zlín.

The theoretical part characterizes the cheese, their classification, composition and production process. This part also contains description of fats, fatty acids and gas chromatography with flame ionization detector.

In the experimental part the contents of free and bound fatty acids in the model samples, produced using combination of microbial cultures are determined and compared. The method described in EN ISO 1735:2005 was used for extraction of lipids from the samples. Fatty acids were converted to methylesters by acidic esterification with methanolic solution of boron trifluoride as a catalyst. Then the fatty acids were assessed using the gas chromatography with flame ionization detector.

The total number of 17 fatty acids in both free and bound form were assessed in samples. Unequivocal influence of addition of thermophilic cultures on the contents of fatty acids cannot be proven.

Klíčová slova

sýry, mastné kyseliny, GC-FID

Keywords

cheese, fatty acids, GC-FID

HAJTMAROVÁ, L. *Profil mastných kyselin sýrů eidamského typu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 63 s. Vedoucí doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

Lucie Hajtmarová

Děkuji doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady, ochotu, laskavost a pomoc při vypracování bakalářské práce. Chci také poděkovat rodině a příteli za trpělivost a podporu během studia a při psaní této práce.

Lucie Hajtmarová

OBSAH

1	ÚVOD	13
2	TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1	Mléko	14
2.1.1	Složení mléka	14
2.1.1.1	Dusíkaté látky	15
2.1.1.2	Bílkoviny	15
2.1.1.3	Sacharidy	15
2.1.1.4	Tuky	15
2.1.1.5	Minerální látky a soli	15
2.1.1.6	Vitaminy	16
2.1.1.7	Enzymy	16
2.2	Vlastnosti mléka	16
2.2.1	Kysací schopnost	16
2.2.2	Syřitelnost	16
2.2.3	Mikrobiologická čistota	17
2.3	Sýry	17
2.3.1	Rozdělení sýrů	17
2.4	Technologie výroby sýrů	18
2.4.1	Úprava mléka	18
2.4.2	Přídavek kyselých kultur, syřidla a aditiv	19
2.4.3	Zpracování syřeniny	19
2.4.4	Formování	19
2.4.5	Solení	20
2.4.6	Zrání	20
2.5	Sýry eidamského typu	22
2.5.1	Výroba sýrů eidamského typu	22
2.6	Lipidy	24
2.6.1	Mléčný tuk	24
2.6.2	Mastné kyseliny	25
2.6.2.1	Nasycené mastné kyseliny	26
2.6.2.2	Nenasycené mastné kyseliny	26
2.7	Plynová chromatografie	27
2.7.1	Základní části plynového chromatografu	27
2.7.1.1	Nosný plyn	28
2.7.1.2	Dávkovací zařízení	28
2.7.1.3	Chromatografická kolona	28
2.7.1.4	Detektory	29
2.7.1.5	Plamenový ionizační detektor	29
2.7.1.6	Chromatogram	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Chemikálie a laboratorní vybavení	31
3.1.1	Chemikálie	31

3.1.2	Plyny	31
3.1.3	Přístroje	31
3.1.4	Pomůcky	31
3.2	Čisté mlékařské kultury	32
3.3	Analyzované vzorky	32
3.4	Použité metody a experimentální postupy	32
3.4.1	Extrakce lipidů ze vzorku sýra	33
3.4.2	Příprava methylesterů mastných kyselin	34
3.4.2.1	Kyselá esterifikace s BF_3 jako katalyzátorem (TAG) . . .	34
3.4.2.2	Kyselá esterifikace s BF_3 jako katalyzátorem (VMK) . . .	36
3.4.3	Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin	39
3.5	Statistické vyhodnocení výsledků	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1	Identifikace a kvantifikace MK ve vzorcích sýra	41
4.2	Srovnání obsahu vázaných MK ve vzorcích sýra	41
4.3	Srovnání obsahu VMK ve vzorcích	43
5	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
	SEZNAM OBRÁZKŮ	49
	SEZNAM TABULEK	50
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
	SEZNAM PŘÍLOH	52
	PŘÍLOHY	53

1. ÚVOD

Sýry jsou jednou z nejhodnotnějších potravin v jídelníčku člověka. Díky obsahu esenciálních aminokyselin jsou dokonce považovány za potravinu plnohodnotnou. Mléčný tuk a bílkoviny obsažené v sýrech jsou důležitým zdrojem využitelné energie. Mléčný tuk také obsahuje důležité esenciální mastné kyseliny a lipofilní vitaminy. Mastné kyseliny jsou důležité kvůli svému vlivu na senzorické a reologické vlastnosti mléka a mléčných výrobků. V mléčném tuku se mastné kyseliny nacházejí především ve formě triacylglycerolů. Vázané mastné kyseliny, ale také mastné kyseliny nacházející se volně v tuku, se liší především fyzikálními vlastnostmi. Složení mastných kyselin má tedy velký vliv na výsledné vlastnosti potraviny, např. na nutriční hodnotu.

Sýr eidamského typu byl oblíbený především v dřívějších dobách, a to pro svoji trvanlivost a odolnost v horších podmínkách. Populární byl i pro svoji dobrou chuť, která se za tu dobu změnila stejně jako jeho tvar. V dnešní době je eidam formován do tzv. cihly, má zlatožlutou barvu a vyskytují se v něm jemné dutinky. Chuť má jemnou, lahodně nasládlou a příjemně slanou.

Cílem této bakalářské práce je stanovit a porovnat obsah mastných kyselin v sýrech eidamského typu vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, které se liší použitými mikrobiálními kulturami. Extrakce tuku ze sýru byla provedena podle normy ČSN EN ISO 1735:2005, následná analýza byla provedena s využitím plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Mléko

Mléko je sekret mléčné žlázy, který produkuje samice savců a je určený jako jediná potrava pro novorozená mláďata. V průběhu laktace má mléko různé složení a vlastnosti, proto ho lze rozdělit na mléko nezralé a zralé. Mléko nezralé se nazývá též mlezivo a je produkováno několik dní po porodu. Naopak mléko zralé je produkováno v pozdějších fázích laktace a využívá se jako potrava nebo pro další zpracování. Dále můžeme mléko dělit na mléko kaseinové, které je produkováno přežvýkavci a mléko albuminové, které produkují masožravci, všežravci a býložravci s jednoduchým žaludkem. Liší se především obsahem bílkoviny kaseinu. Kaseinové mléko obsahuje minimálně 75 % této bílkoviny oproti albuminovému, který obsahuje méně než 75 % [1, 2].

2.1.1. Složení mléka

Složky mléka můžeme rozdělit na původní a nepůvodní. Původní složky se tvoří v mléčné žláze během látkové přeměny a jsou přirozenou složkou nacházející se v mléce; lze je dále rozdělit na hlavní a vedlejší. Nepůvodní složky jsou látky, které se do mléka dostanou intravitálně nebo postsekreticky [3]. Podrobné složení původních a nepůvodních složek mléka viz tabulka 2.1.

Tabulka 2.1 Podrobné rozdělení složek mléka [3]

Původní složky		Nepůvodní složky (nežádoucí)
Hlavní složky	Vedlejší složky	
Voda	Nebílkovinné dusíkaté látky	Pesticidy
Tuk	Antimikrobiální látky	Herbicidy
Bílkoviny	Plyny	Polychlorované uhlovodíky
Sacharidy	Hormony	Dezinfekční látky
	Minerální látky	Těžké kovy
	Enzymy	Mykotoxiny
	Vitaminy	Fungicidy
	Organické kyseliny	Radionuklidy
	Somatické buňky	Čistící prostředky
		Veterinární léčiva

2.1.1.1. Dusíkaté látky

Dusíkaté látky tvoří nejdůležitější a nejkomplexnější složku mléka, definují jeho základní fyzikální a chemické vlastnosti. Některé z dusíkatých látek jsou také důležité kvůli své nutriční hodnotě nebo pro své biologické vlastnosti. Mezi tyto látky se řadí například imunoglobulin nebo enzymy [4].

2.1.1.2. Bílkoviny

Z celkového obsahu dusíku je ho nejvíce přítomno právě v bílkovinách, cca 93 až 95 %. Bílkoviny v mléce jsou velmi důležité pro svoji nutriční hodnotu, patří mezi plnohodnotné bílkoviny [4].

V mléce přežvýkavců mají největší zastoupení kaseiny, ty jsou také nejdůležitější z technologického hlediska. Kaseiny jsou fosfoproteiny, které mají schopnost vázat vápník. V mléce se nacházejí ve formě kaseinových micel, které na sebe mohou vázat velké množství vody. Největší zastoupení mají α -kaseiny, β -kaseiny a κ -kaseiny. Ty se od sebe liší molekulovou hmotností, elementárním složením, obsahem aminokyselin a izoelektrickým bodem. Jediný κ -kasein se nesráží působením iontů vápníku, proto jsou micely obsahující κ -kasein nejstabilnější [3–5].

Jako syrovátkové bílkoviny jsou označeny ty bílkoviny, které po vysrážení kaseinu při pH 4,6 zůstávají v syrovátce. Kvůli svému globulárnímu charakteru jsou řazeny k hydrofilním koloidům. Stabilní koloidní roztok tvoří ve svém nativním stavu. Jsou rozpustné při všech hodnotách pH a mají vyšší nutriční hodnotu než kaseiny. Mezi zástupce syrovátkových bílkovin patří β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérový albumin, imunoglobulin, proteosom – pepton [3–5].

2.1.1.3. Sacharidy

Hlavním sacharidem nacházejícím se pouze v mléce je laktóza, která se v různém množství nachází v mléce všech savců. Skládá se z glukózy a galaktózy, ty jsou vzájemně spojeny β -1,4-glykosidickou vazbou. Laktóza je rozpuštěna ve vodné fázi a je důvodem nasládlé chuti mléka. Minoritně se v mléce nachází i jiné sacharidy, např. D-glukóza, D-galaktóza, D-manóza, D-fruktóza, glukózo-1-fosfát, glukózo-6-fosfát, a jiné [4, 5].

2.1.1.4. Tuky

Vzhledem k tomu, že tato práce je zaměřena především na lipidy a mléčný tuk, bude o něm pojednáno podrobněji v kapitole 2.6.1.

2.1.1.5. Minerální látky a soli

Minerální látky dělíme především podle jejich množství v mléce. Podle obsahu prvků je rozdělujeme na majoritní, minoritní a stopové. Mezi majoritní patří sodík, draslík,

2.2. VLASTNOSTI MLÉKA

hořčík, vápník, chlor, fosfor a síra. Do skupiny minoritních prvků se řadí např. železo a zinek, selen, jod, fosfor, křemík, bor atd. Dále se minerální látky dělí podle fyziologického a nutričního významu. Pro člověka důležité jsou esenciální prvky, které si tělo nedokáže samo syntetizovat a musí se přijímat v potravě. Esenciálních prvků pro člověka je 20 – Na, K, Mg, Ca, Cl, P, S, Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Co, Mo, Cr, Se, I, F, B a Si [3, 5].

2.1.1.6. Vitaminy

Vitaminy řadíme mezi esenciální biokatalyzátory. Plní důležitou funkci prekursorů některých enzymů nebo se uplatňují v oxidačně redukčních systémech. Základní dělení je na vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K, F) a rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B a vitamin C) [6].

2.1.1.7. Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly. Rovněž se dají označit jako biokatalyzátory, protože katalyzují specifické biochemické procesy. Z termodynamického hlediska snižují aktivační energii. Enzymy můžeme rozdělit podle typu katalyzované reakce na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. V mléce jsou nejvíce zastoupen oxidoreduktázy a hydrolázy [3, 7].

2.2. Vlastnosti mléka

Mléko používané pro výrobu sýrů musí mít vysokou kvalitu, tedy dobré chemické složení. Dále musí mít dobrou kysací schopnost, syřitelnost a mikrobiologickou čistotu.

2.2.1. Kysací schopnost

Kysací schopnost určuje, zda budou v mléce růst potřebné mikrobiální kultury, které zajišťují hladký průběh mikrobiálních procesů nezbytných k výrobě sýrů. Bakterie mléčného kvašení jsou velmi citlivé na vnější podmínky, proto je nezbytná vysoká kvalita mléka. V mléce nesmí být přítomny inhibiční látky, protože potlačují rozvoj přidaných kultur. Čerstvé mléko inhibiční látky obsahuje, ale jsou zde zastoupeny jen v malém množství a jejich inhibiční vlastnosti působí jen krátký čas. Více inhibičních látek obsahuje mlezivo, mléko mastitidních a starodojných dojnic a dojnic po vakcinaci [4].

2.2.2. Syřitelnost

Syřitelnost je schopnost mléka vytvořit sýřeninu srážením za pomoci syřidla. Srážení má dvě fáze. V první fázi probíhá proteolýza κ – kaseinu. V druhé fázi za přítomnosti vápenatých kationtů dochází ke koagulaci frakcí kaseinu. Nejdůležitější pro syřitelnost je obsah kaseinu v mléce, obsah jeho frakcí a velikost jeho micel. Dalším důležitým faktorem

je obsah a forma vápníku a fosforu obsažených v mléce, především jako kalcium kaseinátový komplex a kalcium fosfátový komplex. Tyto dva komplexy musejí být v rovnováze. Dále také obsah dalších minerálních látek, hodnota pH nebo teplota mléka. Schopnost tvoření sýřeniny je závislá na fázi laktace, tedy především na složení mléka během těchto fází. Složení mléka se také mění při zánětech mléčné žlázy, při metabolických poruchách nebo při nesprávné výživě. Všechny tyto faktory ovlivňují složení v negativním směru a tím zhoršují syřitelnost. Důsledkem toho je málo celistvá křehká sraženina. Na syřitelnost má vliv také doba a teplota, při které je mléko skladováno [4].

2.2.3. Mikrobiologická čistota

Mikrobiologické požadavky na mléko pro výrobu sýrů jsou velmi přísné. Celkový počet mikroorganismů, koliformních, termorezistentních a psychrotrofních mikroorganismů musí být co nejnižší. Dále by měly kyselinotvorné bakterie převažovat nad alkaligenními. Psychrotrofní a termorezistentní mikroorganismy mohou způsobit časně nebo naopak pozdní duření sýrů [2, 3].

2.3. Sýry

Sýr je podle vyhlášky č. 397/2016 Sb. definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním [8].

Sýry jsou jednou z nejhodnotnějších potravin. Z nutričního hlediska jsou plnohodnotnou potravinou díky obsahu esenciálních aminokyselin. Mléčný tuk a bílkoviny jsou významným zdrojem využitelné energie. Během výroby sýrů dochází ke změnám většiny složek, což má velký vliv na chuť, aroma a konzistenci výsledného produktu [1, 2].

2.3.1. Rozdělení sýrů

Sýry dělíme podle mnoha hledisek [1, 2]:

Podle použitých surovin:

- Přírodní sýr
- Tavený sýr
- Imitace sýrů připravené rekonstitucí složek mléka a mléčných surovin
- Analogy sýrů

Podle druhu použitého mléka:

- Kravské
- Ovčí
- Kozí, apod.

2.4. TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ

Podle obsahu vody v tukuprosté sušině:

- Extra tvrdý (méně než 47 % včetně)
- Tvrdý (47,0 – 54,9 %)
- Polotvrdý (55,0 – 61,9 %)
- Poloměkký (62,0 – 68,0 % včetně)
- Měkký (více než 68 %)

Podle procentuálního obsahu tuku v sušině:

- Vysokotučný (více než 60 % včetně)
- Plnotučný (více než 45 % včetně)
- Polotučný (více než 25 % včetně)
- Nízkotučný (více než 10 % včetně)
- Odtučněný (méně než 10 %)

Podle způsobu zrání:

- Sýry nezrající
 - Čerstvé
 - Termizované
- Sýry zrající
 - Na povrchu
 - S mazem na povrchu
 - V celé hmotě

Podle způsobu srážení:

- Sladké sýry (sladké/syřidlové srážení)
- Kyselé sýry (kyselé srážení)
- Sýry se smíšeným srážením mléka (srážení vlivem syřidla a kyseliny mléčné)

2.4. Technologie výroby sýrů

Nejstarším a technologicky nejnáročnějším odvětvím zpracovávání mléka je výroba sýrů. Při výrobě dochází k velkému množství fyzikálně-chemických a biochemických změn. Sýry vznikají oddělením syrovátky po koagulaci mléka. V sýru jsou soustředovány hlavní složky mléčné sušiny, hlavně kasein a mléčný tuk. Naopak v syrovátce se nachází většina vody, laktózy, bílkovin a solí. Z 10 litrů mléka se vyrobí přibližně 1 kilogram sýru [3, 9]. Orientační schéma výroby sýrů je uvedeno na obrázku 2.1.

2.4.1. Úprava mléka

Mechanické nečistoty, které může mléko obsahovat, jsou odstraněny filtrací nebo centrifugací. Následující technologickou operací je pasterace, která zajistí zdravotní nezávadnost sýrů. Pasterace zhoršuje syřitelnost mléka a oddělování syrovátky, proto musí být použita

tzv. šetrná pasterace, provádí se při cca 75 °C po 15 až 30 s. Během tepelného ošetření se provádí i tzv. standardizace mléka, která upravuje obsah tuku tak, aby byl dosažen u hotových sýrů požadovaný obsah tuku v sušině. U čerstvých sýrů se může také provádět homogenizace [3, 9, 10].

2.4.2. Přídavek zákysových kultur, syřidla a aditiv

V zákysových kulturách se nachází bakterie mléčného kvašení. Ty jsou nezbytné pro výrobu všech tvarohů a sýrů. Přídavek zákysových kultur je důležitý pro úpravu kyselosti mléka před syřením, fermentaci laktózy a tvorbu kyseliny mléčné, uplatnění proteolytické a lipolytické aktivity během zrání a pro vliv na senzorické vlastnosti. Existuje více druhů zákysových kultur, např. termofilní, mezofilní, mazová, plísňová, kvasinkové a kultury bakterií propionového kvašení [9, 11].

Vysrážení kaseinu se může provádět dvěma způsoby. První způsob je kyselé srážení, kdy se snižuje pH na hodnotu blízkou izoelektrickému bodu kaseinu. V druhém případě se koagulace mléka provádí přidáním syřidla. Toto srážení je založené na enzymatickém štěpení peptidové vazby v κ -kaseinu. Používané enzymy jsou chymozin a pepsin [9].

Do mléka se dále přidávají aditivní látky. Chlorid vápenatý se přidává pro lepší syřitelnost a zvýšení pevnosti vzniklého gelu. Dále se přidává dusičnan draselný. Ten zabraňuje duření sýrů, které je způsobené koliformními bakteriemi a bakteriemi máselného kvašení. Pro zlepšení barvy se mohou do sýrů přidávat barviva, např. annato nebo karoten. Při výrobě speciálních sýrů se může přidat koření, zelenina nebo ořechy [9].

2.4.3. Zpracování syřeniny

Prvním krokem zpracování je krájení gelu, který má potřebnou tuhost. Po rozdrobení vzniká syrařské zrno. Čím jemnější zrno, tím tvrdší sýr se vyrobí, protože se uvolní více syrovátky. Vzniklé zrno se míchá v uvolněné syrovátce. Při výrobě polotvrdých a tvrdých sýrů se do výroby zařazuje dohřívání a dosoušení. Teplota dohřívání se volí podle toho, zda jde o sýr s vysoko nebo nízkodohřívanou syřeninou. Všechny tyto kroky podporují synergezi, což je smršťování gelu a uvolňování syrovátky [9, 10].

2.4.4. Formování

Při formování je nutné separovat zrno od syrovátky. Formování je závislé na typu sýru. Tvrdé sýry jsou vkládány a lisovány v nerezových nebo plastových formách. Pařené sýry mohou být formovány do různých tvarů díky své plastické konzistenci. Ostatní sýry se plní do tvořítek, kde se uvolní další syrovátka. Měkké sýry se lisují vlastní vahou, je nutné je otáčet. Polotvrdé a tvrdé sýry s lisují narůstajícím tlakem o 0,005–0,04 MPa po dobu 60 minut a déle. Zvyšování tlaku vede k uzavření povrchu sýru a zamezení odtékání syrovátky. Během lisování probíhá další prokysávání [9].

2.4. TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ

2.4.5. Solení

Solení je důležité pro výslednou chuť, pro zpevnění povrchu, regulaci obsahu vody. Také ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů při zrání. Podle způsobu provedení se solení dělí na solení za tepla (18-20 °C) a za studena (10-12 °C); nebo na solení do zrna, na sucho a v solné lázni. Při solení do zrna se sůl přidává do rozkrájené nebo pomleté sýřeniny před formováním. Při solení na sucho se sůl nebo slaná kaše roztírá po povrchu již vyformovaného sýru. Při solení v solné lázni se sýry vkládají do solného roztoku a nechají se tam několik hodin až dnů. Tento způsob solení se používá nejčastěji [3, 9].

2.4.6. Zrání

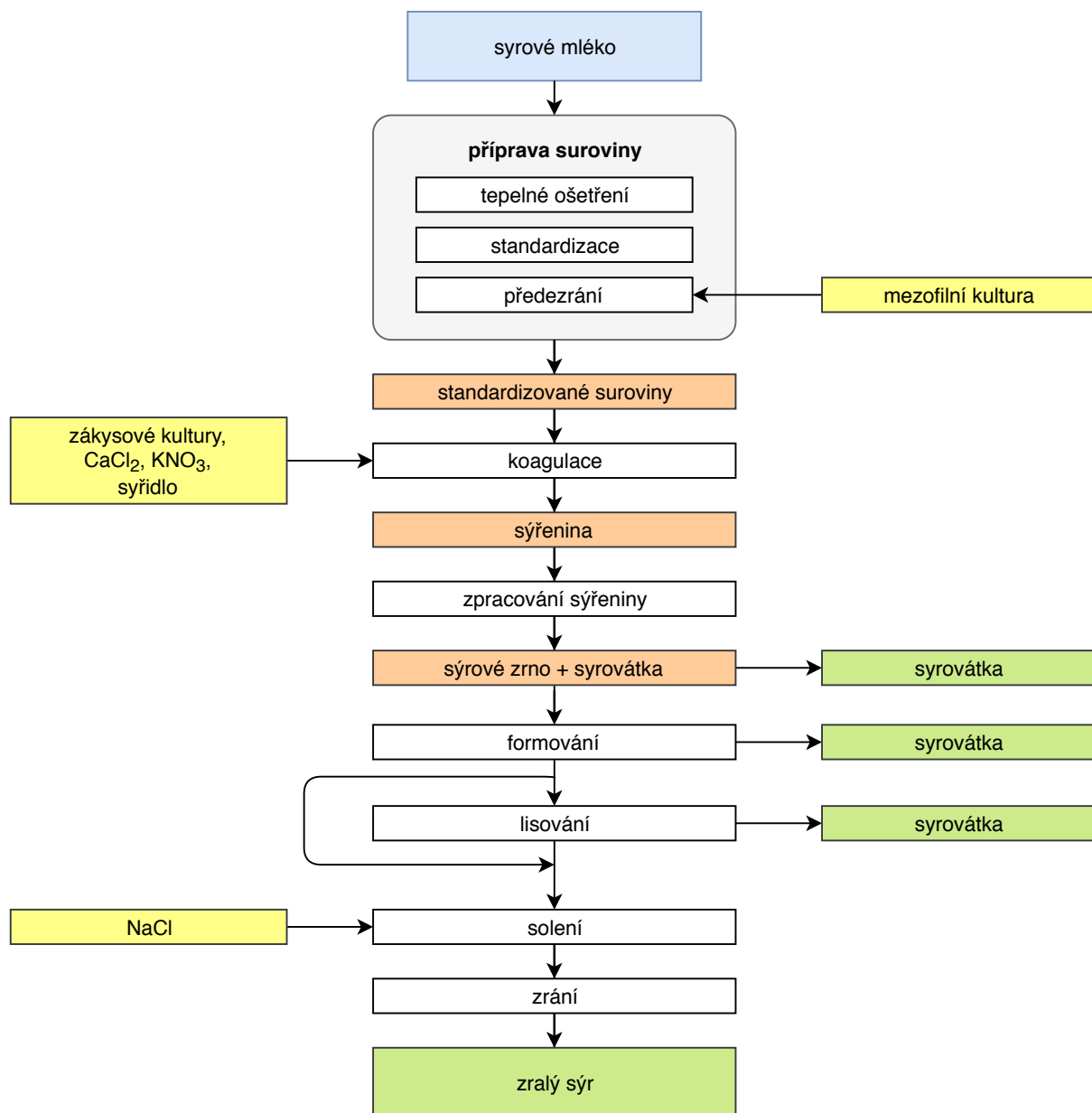
Zrání představuje soubor změn, které jsou způsobeny syřidlovými a nativními enzymy, enzymovou činností kultur, působením enzymů po lýze jejich buněk nebo činností nezákysových kultur. Při těchto změnách sýr získává typický vzhled, konzistenci, chuť, vůni a složení. Během zrání dochází v sýrech ke glykolýze, proteolýze a lipolýze. Ty mají za následek změny textury a vznik aromatických složek [9].

Během výroby sýrů jsou technologické operace zaměřeny především na regulaci aktivity kultur, na niž závisí rozsah a rychlost fermentace laktózy. Největší část zadržené laktózy se fermentuje během lisování nebo během prvních dvou dnů zrání. Tento proces probíhá při tzv. předběžném zrání sýrů, tedy při zpracování mléka, sýřeniny, formování a solení. V rámci 24 hodin musí sýry dosáhnout požadované kyselosti. U tvrdých sýrů je tato hranice pH 5,2, u měkkých sýrů 4,8-5,0. Pufrujícími složkami v mléce se zneutralizuje kyselina mléčná, která je poté zachycena ve sraženině jako mléčnan. U některých druhů sýrů (s tvorbou ok) má mléčnan funkci jako substrát pro další kultury v pozdějším stádiu zrání. U jiných druhů sýru může být mléčnan rozkládán při máselném kvašení. Při tomto kvašení vzniká vodík, oxid uhličitý a těkavé mastné kyseliny. Vodík je příčinou pozdějšího duření sýrů [9].

Během zrání polotvrdých a tvrdých sýrů dochází k rozkladu bílkovin. Hlavními původci tohoto rozkladu jsou syřidlo, mikrobiální proteolytické enzymy a plazmin. Nejdříve je štěpen parakasein enzymy syřidel nebo, v případě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, plazminem. To poté výrazně urychluje mikrobiální enzymy, které mají za úkol rozštěpit polypeptidy na polypeptidy s nižší molekulovou hmotností, dipeptidy nebo až na aminokyseliny. Během špatného průběhu zrání mohou vznikat nežádoucí nebo dokonce škodlivé látky. Produkty degradace aminokyselin mohou být např. amoniak, močovina, kyselina máselná, vodík nebo biogenní aminy. Dalším produktem rozkladu bílkovin jsou těkavé mastné kyseliny, které se podílejí na chuti sýrů [9].

Výrazné změny při zrání jsou především u konzistence sýrů. Ta je závislá na bobtnání parakaseinu, na které má vliv obsah kyseliny mléčné. Při optimálním množství kyseliny mléčné vytváří parakasein laktát. Ten je rozpustný v 5% roztoku chloridu sodného při pH 5,2. Sodné ionty v parakaseinu vytěsní vápenaté ionty, čímž se sýr zvláční a nabobtná. Pokud je však přebytek kyseliny mléčné, netvoří se laktát ale nerozpustný bilaktát. Konzistence je tuhá, protože jsou vápenaté ionty vytěsněny kyselinou [9].

Zrání můžeme rozdělit podle průběhu na aerobní a anaerobní. Anaerobní probíhá v celé hmotě sýru. Aerobní probíhá od povrchu dovnitř působením povrchové mikroflóry. U většiny sýrů se tyto druhy doplňují. Sýry, u kterých probíhá jen zrání v celé hmotě, jsou po solení zabaleny do zracích fólií, opatřeny ochranným plastovým nátěrem nebo je jejich povrch ošetřován solným roztokem nebo lněným olejem, aby bylo zabráněno přístupu kyslíku a vody, ale aby mohl odcházet oxid uhličitý. U zrání sýrů je důležitá především teplota, doba zrání a vlhkost u sýrů, které zrají bez obalu [9].



Obrázek 2.1 Schéma výroby sýrů [9]

2.5. Sýry eidamského typu

Vzhledem k zaměření této práce jsou v této kapitole blíže charakterizovány sýry eidamského typu, které byly analyzovány v experimentální části.

Svůj název eidam získal po přístavním městě v Nizozemsku, ve kterém se s ním ve velkém obchodovalo. Ve světě se můžeme také setkat s označením edam nebo edammer. Od dob první výroby se eidam hodně změnil. V době své velké popularity od 14. do 18. století to byl jeden z nejoblíbenějších sýrů. Oblíbený byl především kvůli svému praktickému využití při zámořských plavbách a získal si oblibu i ve vzdálených koloniích. Populární tedy nebyl jen díky své dobré chuti, ale především proto, že ho bylo snadné brát na cesty díky jeho trvanlivosti a odolnosti v horších podmínkách. Dříve se eidam vyráběl z plnotučného mléka, obsah tuku se pohyboval okolo 40 % a jeho chuť byla mnohem jemnější. Formoval se do tvaru koule o průměru 13 cm, která vážila přibližně 1,5 kg [12, 13].

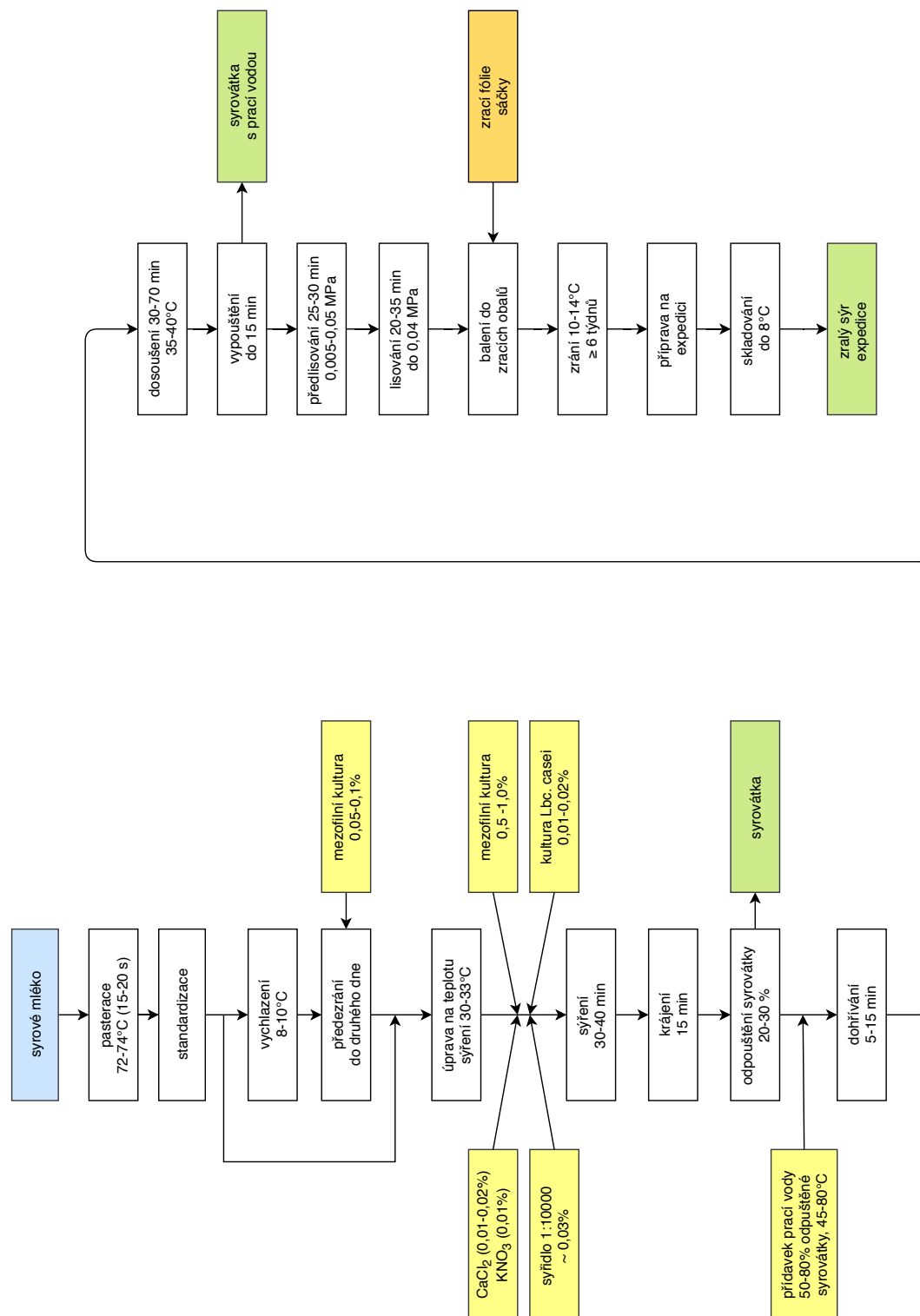
V dnešní době se setkáme především s eidamem vyrobeným z částečně odstředěného kravského mléka. Co se týče obsahu tuku, vyrábí se eidam ve více variantách – 20, 30 a 45 %. Pro eidam je typický jeho červený voskovaný obal. Ten ho chrání při exportu během cesty především proti vysychání. Sýry pro domácí trh se ve většině případů neparafinují. Eidam se sám pokrývá přirozenou tenkou kůrou [13–16].

2.5.1. Výroba sýrů eidamského typu

Po klasické pasteraci a standardizaci se do mléka přidává mezofilní kultura. Mezofilní kultura pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou obsahuje *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Pro rychlejší zrání sýrů se může také použít *Lactobacillus casei* nebo *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* [11].

Sýry eidamského typu se jako sýry s nízkodohřívanou sýřeninou řadí do skupiny sýrů s anaerobním zráním v celé hmotě. Pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou je typické dohřívání vodou na teploty do 40 °C. Čím nižší obsah tuku, tím nižší teploty a kratší doba zpracování se provádí. Dále probíhá praní syrového zrna. Tento proces snižuje množství laktózy a řídí průběh prokysávání. Množství prací vody se musí regulovat. Velké množství prací vody vede ke gumovité konzistenci a prázdné chuti. Naopak malé množství prací vody vede ke kyselejší chuti a ke sklonu k trhlinám. Po praní zrna přichází na řadu předlisování a lisování, sýry následně dokysávají v solné lázni. Díky tomu dochází k uzavření syrovátky vně sýru a tvorbě solného prstence. Délka zrání sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou závisí na velikosti a také na tom, jestli sýry zrají ve fólii nebo pod nátěrem. Doba zrání je většinou 6 až 8 týdnů [9]. Schéma výroby sýrů eidamského typu je uvedeno na obrázku 2.2.

Konečný výrobek má typicky zlatožlutou barvu těsta a vyskytují se v něm jemné dutinky. Jeho chuť je jemná, lahodně nasládlá a příjemně slaná [16].



Obrázek 2.2 Schéma výroby sýrů eidamského typu [9]

2.6. Lipidy

Lipidy jsou strukturně i funkčně různorodá skupina molekul. Obecně jsou hydrofobní, i když mnohé mají kromě uhlovodíkového jádra také polární nebo nabitě skupiny. Vzhledem ke své strukturální rozmanitosti plní lipidy více funkcí. Primárně plní funkci zásoby energie a tvorby membránových struktur. Ve většině případů se k lipidům řadí také netěkavé lipofilní sloučeniny, které doprovázejí lipidy v přírodních a průmyslových produktech. Mezi tyto doprovodné látky se řadí např. terpenoidy, steroidy, karotenoidy, lipofilní vitaminy, některá barviva nebo přírodní antioxidanty [17–19].

Tuky dělíme podle chemického složení do tří skupin. První skupinou jsou homolipidy, což jsou sloučeniny mastných kyselin a alkoholů. Druhou skupinou jsou heterolipidy, což jsou lipidy, které obsahují mastné kyseliny, alkohol a další kovalentně vázané sloučeniny, např. kyselina fosforečná nebo D-glukopyranóza. Třetí skupinou jsou komplexní lipidy, ve kterých jsou přítomny jak homolipidy, tak heterolipidy. Na rozdíl od prvních dvou skupin komplexní lipidy obsahují nejen kovalentní, ale také další fyzikální vazby, jako jsou vodíkové můstky nebo hydrofobní interakce [19].

2.6.1. Mléčný tuk

Mléčný tuk je nejvariabilnější složkou mléka všech savců v kvalitě i kvantitě. Je to významný zdroj esenciálních mastných kyselin a lipofilních vitamínů. Dále má vliv na senzorycké a reologické vlastnosti mléka a mléčných výrobků. Hlavní složkou v mléčném tuku jsou triacylglyceroly. V malém množství lze v mléce najít také diacylglyceroly a v minimálním množství také monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny [5]. Přesnější složení frakcí mléčného tuku u většiny savců je uvedeno v tabulce 2.2.

Další složkou mléčného tuku jsou fosfolipidy. Většina z nich má ve své molekule nahrazenou jednu z mastných kyselin estericky vázanou kyselinou fosforečnou, na kterou je navázán cholin, serin nebo ethanolamin. Z celkového množství tuku zaujímají < 1 %. Tvoří důležitou složku membrány tukových kuliček a tím stabilizují tukovou emulzi [3, 4].

Tabulka 2.2 Zastoupení jednotlivých frakcí mléčného tuku [5]

Frakce	[%]
Triacylglyceroly	98,0
Diacylglyceroly	0,3
Monoacylglyceroly	0,03
Volné mastné kyseliny	0,1
Fosfolipidy	0,8
Steroly	0,3
Karotenoidy	stopové množství
Vitaminy rozpustné v tucích	stopové množství
Aromatické látky	stopové množství

Obecně se mléčný tuk zařazuje mezi živočišné tuky. Vlastnosti mléčného tuku se mění s jeho složením. Jeho konzistence a nutriční hodnota se mění v závislosti na poměru nasycených, nenasycených a polynenasycených mastných kyselin. Čím větší podíl nenasycených a polynenasycených mastných kyselin, tím vyšší je jeho nutriční hodnota. Velký vliv na složení mléčného tuku má složení krmiva dojníc. V letních měsících je mléčný tuk měkčí a vláčnější, protože obsahuje více nenasycených mastných kyselin. Dále také obsahuje více karotenů a tím je v létě žlutější než v zimě. Mléčný tuk má také schopnost pohlcovat pach, to může ovlivnit chuť a vůni výrobku. Rozkladem mléčného tuku vznikají volné mastné kyseliny, které snižují nutriční hodnotu a zhoršují sensorické vlastnosti mléka. Mléčný tuk obsahuje mnoho vitaminů, ale také biologicky aktivní látky, např. hormony nebo enzymy. Vyskytuje se ve formě tukových kuliček. To jsou kulovité útvary, ve kterých je tuk obalen membránou a jsou rozptýleny v mléce. Tukové kuličky jsou z asi 98 % tvořeny triacylglyceroly. To jsou estery glycerolu a mastných kyselin. Obsah tuku v mléce se pohybuje mezi 3,2 do 5 % [20, 21]. Obsah jednoduchých lipidů a fosfolipidů v mléce různých savců je uveden v tabulce 2.3.

Tabulka 2.3 Obsah lipidů v mléce různých savců [22]

Lipidy	Kravske [%]	Buvolí [%]	Mateřské [%]	Potkaní [%]
Triacylglyceroly	97,5	98,6	98,2	87,5
Diacylglyceroly	0,36	stop. mn.	0,7	2,9
Monoacylglyceroly	0,027	stop. mn.	stop. mn.	0,4
Estery cholesterolu	stop. mn.	0,1	stop. mn.	-
Cholesterol	0,31	0,3	0,25	1,6
Volné mastné kyseliny	0,027	0,5	0,4	3,1
Fosfolipidy	0,6	0,5	0,26	0,7

2.6.2. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou nejjednodušší lipidy a jsou také složkou složitějších lipidů. Skládají se z hydrofobního uhlovodíkového řetězce, který je zakončen karboxylovou skupinou. Jejich délka je ve většině případů 12 až 24 uhlíků. Při fyziologickém pH se karboxylová skupina ionizuje na karboxylátový aniont. Tato aniontová skupina má afinitu k vodě, tím dostává mastná kyselina amfifilní vlastnosti. U mastných kyselin s dlouhým řetězcem převažuje hydrofobní část. Tyto molekuly jsou nerozpustné ve vodě a při transportu oběhem musí být v přítomnosti proteinů. Mastné kyseliny obsažené v plazmě jsou z 90 % ve formě esterů. Neesterifikované mastné kyseliny jsou v oběhu transportovány za přítomnosti albuminu. U lidí převažují nasycené a mononenasycené [17, 18].

Většina přirozeně se vyskytujících mastných kyselin má sudý počet atomů uhlíku, protože jsou syntetizovány postupnými adicemi dvouuhlíkatých prekurzorů. Jejich délka se pohybuje mezi 4 až 26 atomy uhlíku. Běžně mají mastné kyseliny lineární uhlovodíkový řetězec. Některé mastné kyseliny však mohou mít také cyklické struktury [17, 23].

2.6. LIPIDY

Většina mastných kyselin nacházejících se v mléčném tuku pochází z krmiva nebo z mikrobiální aktivity v bachoru krávy. Mastné kyseliny jsou syntetizovány v mléčné žláze, jejich délka je mezi 4 a 16 atomy uhlíku [22]. Přehled nejdůležitějších mastných kyselin mléčného tuku je uveden v tabulce 2.4.

Tabulka 2.4 Nejdůležitější mastné kyseliny mléčného tuku [20]

Mastná kyselina	Vzorec	Množství [%]
Kyselina máselná	$C_4H_8O_2$	3 – 5
Kyselina kapronová	$C_6H_{12}O_2$	1 – 4
Kyselina kaprylová	$C_8H_{16}O_2$	1 – 3
Kyselina kaprinová	$C_{10}H_{20}O_2$	1,5 – 4
Kyselina laurová	$C_{12}H_{24}O_2$	1,5 – 5
Kyselina myristová	$C_{14}H_{28}O_2$	6 – 13
Kyselina palmitová	$C_{16}H_{32}O_2$	16 – 40
Kyselina stearová	$C_{18}H_{36}O_2$	6 – 15
Kyselina olejová	$C_{18}H_{34}O_2$	25 – 43
Kyselina linolová	$C_{18}H_{32}O_2$	2 – 6
Kyselina linolenová	$C_{18}H_{30}O_2$	0,2 – 0,4
Kyselina arachidonová	$C_{20}H_{32}O_2$	1,2 – 1,8

2.6.2.1. Nasycené mastné kyseliny

Mastné kyseliny se dělí na nasycené a nenasycené. Nasycené neobsahují žádnou dvojnou vazbu a jsou tuhé. Nejběžnější nasycenou mastnou kyselinou je kyselina palmitová, která se vyskytuje skoro ve všech živočišných a rostlinných lipidech. Běžná je pro triacylglyceroly i fosfolipidy. Mléčné lipidy jsou tvořeny z více jak poloviny nasycenými mastnými kyselinami. Tyto mastné kyseliny jsou povětšinou s krátkými řetězci. Mastné kyseliny se středně dlouhými řetězci se v mléčném tuku vyskytují jako minoritní složka. Velmi vzácně se mohou v triacylglycerolech vyskytovat mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků v řetězci [18, 19, 22, 23].

2.6.2.2. Nenasycené mastné kyseliny

Mnohé důležité přirozeně se vyskytující mastné kyseliny jsou nenasycené. Nenasycené mastné kyseliny obsahují jednu nebo více dvojných vazeb a jsou olejovité. Většina přirozeně se vyskytujících nenasycených mastných kyselin má cis konfiguraci. Tato konfigurace má velký vliv na molekulární strukturu, kdy v každé dvojně vazbě vzniká rigidní ohyb. Více dvojných vazeb v řetězci způsobuje tzv. zauzlení. U každé vazby v uhlovodíkovém řetězci existuje také svobodná rotace, tato vlastnost zajišťuje mnoho konformací molekul. U nenasycených mastných kyselin jsou dvojně vazby rozmístěny v tříuhlíkatých intervalech [17, 18, 23].

Nenasycené mastné kyseliny nacházející se v živočišných a rostlinných lipidech mají povětšinou přímý řetězec dlouhý 10-36 atomů uhlíku. Nejběžnější nenasyčenou mastnou kyselinou je kyselina olejová, která se vyskytuje skoro ve všech živočišných a rostlinných lipidech [19].

2.7. Plynová chromatografie

Pro stanovení mastných kyselin v experimentální části této práce byla použita plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID). Plynová chromatografie je analytická metoda, založená na oddělování složek směsi, používaná s účelem zjistit informace o přesném složení směsi. Je možné separovat i velmi složité směsi, hojně se proto používá při stanovení organických sloučenin. Funguje na principu rovnovážného rozdělení koncentrace analytu mezi mobilní a stacionární fázi na základě adsorpce nebo rozpouštění. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Může být pevná nebo kapalná. Mobilní plynná fáze se pohybuje s využitím tlakového spádu [24, 25].

Podle mechanismu separace se plynová chromatografie dělí na adsorpční a rozdělovací. Při adsorpční chromatografii probíhá separace adsorpcí na pevný sorbent, používá se aktivní uhlí, silikagel nebo alumina. Tato metoda se používá pro analýzu plynných látek nebo velmi těkavých kapalných látek. Se zvyšující se teplotou klesá účinnost adsorpce. Během analýzy jsou jednotlivé prvky převedeny na ekvivalentní množství svých plynů. V průběhu rozdělovací chromatografie probíhá separace na základě různé rozpustnosti v kapalně stacionární fázi, která je imobilizovaná na částicích nosiče nebo na stěnách kapilární kolony. Velký vliv na separaci má rozpustnost látek, protože značně ovlivňuje jejich těkavost, a tedy i retenci v koloně. Tato metoda se využívá pro vzorky kapalin s teplotou varu do 400 °C. Netěkavé nebo termolabilní látky je nejdříve potřeba derivatizovat [26].

V plynové chromatografii je nutné všechny kapalně vzorky nejdříve převést do plynného stavu. Kapalně vzorek se musí převést na těkavou formu, proto se pomocí plynové chromatografie dají separovat jen takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a jejich relativní molekulová hmotnost není větší než 1000 [27].

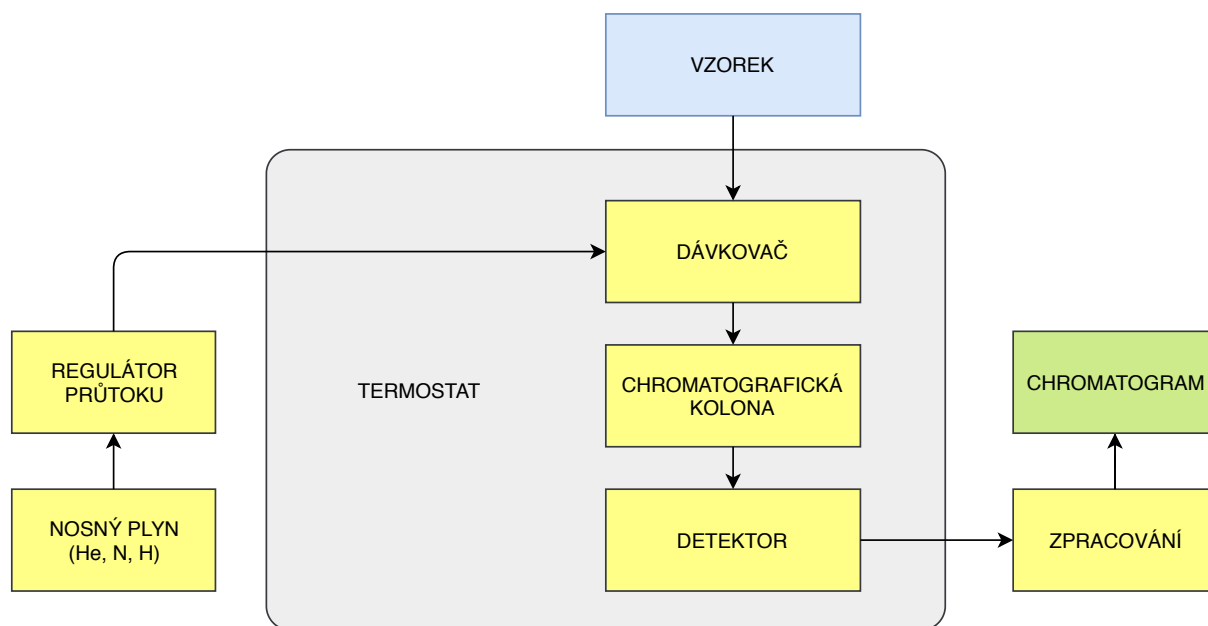
2.7.1. Základní části plynového chromatografu

Plynový chromatograf se skládá z [28]:

- Zásobník plynné fáze
- Zařízení na regulaci tlaku, resp. průtoku plynné fáze
- Dávkovací zařízení
- Chromatografická kolona
- Termostat se zařízením pro izotermickou analýzu a pro analýzu s programovatelnou změnou teploty
- Detektor
- Zařízení na zpracování signálu detektoru a jeho záznam
- Zařízení na vyhodnocení analýzy

2.7. PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Na obrázku 2.3 je znázorněno jednoduché schéma zařízení plynového chromatografu.



Obrázek 2.3 Schéma plynového chromatografu

2.7.1.1. Nosný plyn

Nosný plyn je v plynové chromatografii mobilní fáze. Jeho úkolem je transport látek chromatografickou kolonou. Vliv na výběr vhodného nosného plynu má použitý detektor, inertnost, čistota, viskozita a hustota plynu a bezpečnost při práci. Nosný plyn se uchovává v zásobních tlakových láhvích. Nejpoužívanějšími nosnými plyny jsou dusík, vodík, helium a argon. Během analýzy je důležité udržovat stálý průtok nosného plynu. V opačném případě může kolísavý průtok plynu ovlivnit kvantitativní i kvalitativní analýzu [28].

2.7.1.2. Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení má za úkol rychle a reprodukovatelně nadávkovat vzorek do kolony. Dávkovaný vzorek musí být těkavý a koncentrace analytu musí být dostatečná. V koloně se musí zamezit změnám teploty a tlaku. Plynné látky se dávkují za pomoci dávkovacích ventilů. Kapalné látky se dávkují injekčními stříkačkami přes septum do vyhřívané dávkovací komory, která se promývá nosným plynem. Kapalné vzorky musí být po dávkování ihned odpařeny. Nástřik může být prováděn i pomoci techniky head-space [26, 28].

2.7.1.3. Chromatografická kolona

V chromatografické koloně je umístěna stacionární fáze a rozděluje se zde vzorek na složky. Rozlišují se dva druhy: náplňové a kapilární kolony. Náplňové kolony jsou nejčastěji z nerezové oceli, hliníku, teflonu, polyethylenu nebo skla. Jsou plněné porézním inertním

nosičem, např. aluminosilikátem. Při analýze se na povrchu inertního nosiče tvoří tenký kapalný film. Náplňové kolony mají nižší separační schopnost, tedy omezený maximální počet složek, které lze oddělit. Kapilární kolony jsou tvořeny křemennou kapilárou, jejíž vnější povrch je chráněn vrstvou polymeru. Na stěnách je nanesen film stacionární fáze. Většinou se používá stejná stacionární fáze, jako u povrchu inertních nosičů náplňových kolon. Oproti náplňovým kolonám mají kapilární kolony podstatně vyšší dělicí účinnost [26, 28, 29].

Pro dobře provedenou a reprodukovatelnou analýzu je nutné, aby měla kolona potřebnou a stálou teplotu. Vzorek během celé analýzy musí zůstat v plynném stavu, proto je kolona umístěna v termostatu [28].

2.7.1.4. Detektory

Detektory jsou určeny pro detekci složek v nosném plynu, který opouští chromatografickou kolonu. Reaguje na změnu fyzikálních nebo chemických změn nosného plynu, ke kterým dochází přítomností eluovaných látek. U detektoru je důležitá rychlá odezva, vysoká citlivost a stabilita základního signálu. Detektory se dělí na dvě skupiny podle dějů, které probíhají při detekci. První skupinou jsou nedestrukční detektory. V těchto detektorech se měřená látka při detekci chemicky nezmění. Do této skupiny se řadí např. tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového zachytu a infračervený spektrometr. Druhou skupinou jsou detektory destrukční. V těchto detektorech se měřená látka průchodem ireverzibilně změní. Do této skupiny patří např. plamenový ionizační a termoionizační detektor a hmotnostní spektrometr [26, 28, 29].

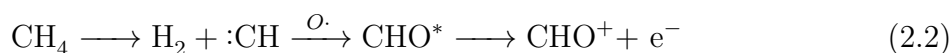
2.7.1.5. Plamenový ionizační detektor

Plamenový ionizační detektor (FID) je nejčastěji používaným detektorem v plynové chromatografii. Má jednotkovou uhlíkovou odezvu a široký lineární provozní rozsah. Dalšími výhodami jsou nízké náklady na jeho chod, snadné použití, rychlá odezva a robustnost. Rychlost odezvy je úměrná hmotnosti uhlíku, který jím projde za jednotku času. Tato úměra je lineární, nezávisí tedy na složitosti struktury. Díky této uhlíkové odezvě není nutné mít pro každou složku kalibrační standard. Množství složky je úměrné ploše píku. Procenta plochy tedy odráží hmotnostní složení daných složek směsi [30].

Plamenově ionizační detektor využívá mechanismu, kterým se většina organických látek redukuje na nasycené protějšky v počáteční části plamene při nižších teplotách. Při cestě plamenem tyto nasycené látky reagují s přítomnými atomy vodíku za vzniku methanu.



Methan se v plameni vznítí a spaluje se na formylový kation CHO^+ , který je původcem FID signálu.



2.7. PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Během tohoto děje může docházet i k dalším reakcím.



Všechny kladné ionty se sbírají záporně vychýleným kolektorem, což způsobuje tok proudu, který je následně zesílen a digitalizován. Proud je úměrný počtu prošlých iontů. Jeden iont, který projde přes detektor, odpovídá 106 atomům uhlíku. Přesto FID odpovídá schopnosti detekce na úrovni pikogramů. Elektrony proudí v opačném směru a jsou uzemněny ve FID plamenu [30].

Během spalování jsou uhlovodíky oxidovány, případně tvoří CO_2 a H_2O . Nabité meziprodukty vedou k odezvě FID. Molekuly, které obsahují kyslík, se neoxidují a poskytují nižší odezvu na molekulu nebo hmotnost eluovaného analytu, tedy plocha a výška píku je menší, než u jejich nasycených protějšků. Odezva pro sloučeniny obsahující kyslík klesá v pořadí: alkoholy, ethery, aldehydy, ketony > estery > kyseliny. Detektor nedává odezvu na H_2O , CS_2 , HCOOH , $(\text{COOH})_2$, NH_3 , H_2S [29, 30].

2.7.1.6. Chromatogram

Data vystupují ve formě chromatogramu. Ten se vytváří průběžným zaznamenáváním elektrického signálu generovaným detektorem. Základní linie chromatogramu se tvoří čistým nosným plynem, který opouští kolonu. Po oddělení složky směsi složka vstoupí do detektoru. Signál z detektoru se nejdříve zvýší a po opuštění složky z detektoru se opět vrátí na základní linii. V maximu píku bylo dosaženo maximální koncentrace nebo hmotnostního průtoku eluované látky. Při optimálním rozdělení složek směsi se objevují píky na chromatogramu odděleně. Plocha a výška píku poskytují informace o množství odpovídající eluované složce [31].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie a laboratorní vybavení

3.1.1. Chemikálie

- Diethylether p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Petrolether p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Hexan p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Ethanol 96%, Lach-Ner, Neratovice
- Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Isooktan p.a., Lach-Ner, Neratovice
- Methanol
- Kyselina chlorovodíková p.a., PENTA, Chrudim
- BF_3 (14% roztok methanolu), p.a., SIGMA-ALDRICH, Německo
- Směsný standard metylesterů mastných kyselin – FAME mix 37, SIGMA-ALDRICH, Německo

3.1.2. Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem a kovovou membránou
- Vodík 5.5 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem pro kyslík

3.1.3. Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-WAX (30 m x 0,32 mm x 0,5 μm) s výstupem na PC
- Počítač PC, Intel Pentium procesor
- Analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie
- Vakuová rotační odparka
- Chladnička s mrazničkou

3.1.4. Pomůcky

- Mikrostříkačka Hamilton 100 μl
- Běžné laboratorní sklo
- Mikropipety BIOHIT 1000, 200, 100 μl
- Vialky s kaučuk-teflonovými septy a šroubovacími uzávěry
- Struhadlo

3.2. ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY

3.2. Čisté mlékařské kultury

Pro výrobu modelových sýrů eidamského typu byly použity komerčně dostupné lyofilizované kultury vhodné k přímému zaočkování do mléka (Laktoflora[®], Milcom, Česká republika); CCDM (Česká sbírka mlékářských mikroorganismů).

- Mezofilní směsná kultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (kmen CCDM 946)
- *Lactobacillus casei* (kmen CCDM 198)
- *Lactobacillus casei* (kmen CCDM 422)
- *Lactobacillus plantarum* (kmen CCDM 187)
- *Lactobacillus plantarum* (kmen CCDM 189)

3.3. Analyzované vzorky

V experimentální části bakalářské práce byly analyzovány modelové vzorky přírodních sýrů eidamského typu (45 % tvs., 50 % sušiny), vyrobené standardním technologickým postupem na Univerzitě Tomáši Bati ve Zlíně. Celkem bylo vyrobeno 5 sérií vzorků, které se lišily kombinací použitých mikrobiálních kultur; u všech byla jako základ použita mezofilní kultura s přídavkem vybraného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, a dále vybrané kmeny *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Vzorky byly analyzovány v počáteční fázi zrání (14 dní po výrobě). Přehled všech analyzovaných vzorků je uveden v tabulce 3.1. Vzorky byly ihned po odběru zmrazeny (−18 °C) a uchovávány při těchto podmínkách až do doby analýzy.

Tabulka 3.1 Přehled a označení vzorků

Vzorek	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus casei</i> (kmen CCDM 422)	<i>Lactobacillus casei</i> (kmen CCDM 198)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (kmen CCDM 187)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (kmen CCDM 189)
D	+	−	−	−	−
G	+	+	−	−	−
J	+	−	+	−	−
H	+	−	−	+	−
I	+	−	−	−	+

3.4. Použité metody a experimentální postupy

Použité metody a experimentální postupy byly převzaty z diplomové práce Dominika Kovala [32].

3.4.1. Extrakce lipidů ze vzorku sýra

Extrakce lipidů ze vzorku sýra byla provedena podle normy ČSN EN ISO 1735:2005.

Princip:

Netukové látky výrobku se rozpustí a dojde k uvolnění tuku, který se vytřepe kvantitativně směsí diethyletheru a petroletheru. Po odpaření rozpouštědel se tuk zváží.

Přístroje a pomůcky:

Struhadlo, nůž, zkumavka, dělicí nálevka, destilační baňka s kulatým dnem 50 ml, vodní lázeň, pipeta 5 a 10 ml, analytické váhy, vakuová odparka.

Chemikálie:

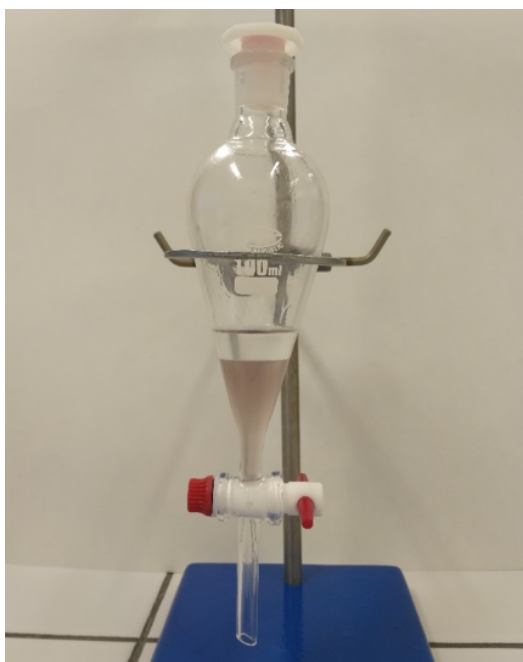
Kyselina chlorovodíková 35% p.a., ethanol 96% obj. p.a., diethylether p.a., petrolether p.a.

Postup:

Sýr byl nejemno nastrohán na struhadle. Do zkumavky byl navážen 1 g s přesností na čtyři desetinná místa, bylo přidáno 5 ml kyseliny chlorovodíkové a směs byla zahřívána ve vodní lázni při 80 °C do rozpuštění veškerého sýru. Směs byla ochlazena pod tekoucí vodou.

Pomocí 5ml ethanolu byla směs převedena kvantitativně do dělicí nálevky. Ke směsi bylo postupně přidáváno 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru. Po každém přidavku byla promíchána. Poté byla směs nechána 30 minut odstát viz obrázek 3.4.1. Horní čirá fáze byla oddělena od vodné fáze a odebrána do vysušené a zvážené destilační baňky s kulatým dnem (50 ml). Následně byla provedena druhá a třetí extrakce s polovičním množstvím rozpouštědel. Všechny tři extrakty byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce při teplotě do 40 °C.

Množství tuku bylo zjištěno gravimetricky – vyextrahovaný tuk byl zvážen na analytických vahách s přesností na 0,000 1 g a od naměřené hmotnosti byla odečtena hmotnost čisté destilační baňky.



Obrázek 3.1 Extrakce lipidů, oddělené fáze

3.4. POUŽITÉ METODY A EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

Procentuální obsah tuku se vypočítá pomocí vzorce:

$$w_{\text{tuk}} = \frac{m_{\text{tuk}} \cdot 100 \%}{m_{\text{sýr}}} \quad (3.1)$$

w_{tuk}	procentuální obsah tuku [%]
m_{tuk}	hmotnost vyextrahovaného tuku ze vzorku [g]
$m_{\text{sýr}}$	navážka vzorku sýra [g]

Procentuální obsah tuku v sušině se vypočítá pomocí vzorce:

$$w_{\text{tvs}} = \frac{w_{\text{tuk}} \cdot 100 \%}{w_{\text{suš}}} \quad (3.2)$$

w_{tvs}	procentuální obsah tuku v sušině [%]
w_{tuk}	obsah tuku [%]
$w_{\text{suš}}$	obsah sušiny [%]

3.4.2. Příprava methylesterů mastných kyselin

Pro přípravu methylesterů byla použita kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem; zvláště pro stanovení všech (TAG) a volných (VMK) mastných kyselin.

3.4.2.1. Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG)

Princip:

Glyceroly jsou v prvním kroku bazicky katalyzované reakce transmethylovány pomocí methanolického roztoku hydroxidu sodného na methylestery, přítomné volné mastné kyseliny (VMK) jsou převedeny na soli. V druhém kroku kyselá katalyzovaná reakce jsou soli mastných kyselin (MK) převedeny na methylestery (MeMK) reakcí s komplexem bortrifluorid-methanol.

Přístroje a pomůcky:

Destilační baňka s kulatým dnem, zpětný chladič, topné hnízdo, pipeta 5 a 20 ml, vialka 2 a 4 ml.

Chemikálie:

Methanolický roztok hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), bortrifluorid methanolický roztok 10%, isooktan p.a., chlorid sodný p.a. (nasycený vodný roztok), síran sodný bezvodý p.a.

Postup:

Do destilační baňky s vyextrahovaným tukem byly přidány 4 ml roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a varný kamínek. K baňce byl připojen zpětný chladič, byla vložena do topného hnízda a obsah byl vařen pod zpětným chladičem viz obrázek 3.2, dokud nevymizely kapičky tuku. V průběhu varu bylo destilační baňkou mícháno, aby se na stěnách baňky nevytvořil pevný kroužek hydroxidu sodného.



Obrázek 3.2 Esterifikace s bortrifluoridem

Po 10 minutách varu bylo do vroucí směsi přes zpětný chladič přidáno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a ve varu bylo pokračováno po 20 minut. Poté byly do vroucí směsi přes horní konec chladiče přidány 3 ml isooktanu, destilační baňka byla vyjmuta z topného hnízda a var byl zastaven.

Ihned po zastavení varu bylo do směsi přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka byla uzavřena a protřepávána 15 sekund. Poté bylo přidáno větší množství nasyceného vodného roztoku chloridu sodného tak, že hladina kapaliny dosáhla hrdla baňky a byl jasný přechod mezi dvěma fázemi. Baňka byla pro oddělení fází ponechána 5 minut stát viz obrázek 3.3.



Obrázek 3.3 Destilační baňka s roztokem s oddělenými fázemi

3.4. POUŽITÉ METODY A EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

Z horní isooktanové vrstvy byly odebrány 2 ml do 4 ml vialky, bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml do vialky pro analýzu na plynovém chromatografu viz obrázek 3.4.



Obrázek 3.4 Vialka se vzorkem připravená na analýzu GC-FID

Příprava methanolického roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$):

Navážka 2 g NaOH byla za mírného ohřívání ve vodní lázni rozpuštěna ve 100 ml methanolu. Připravený roztok byl uchováván v lednici.

3.4.2.2. Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK)

Princip:

Volné mastné kyseliny jsou esterifikovány zahříváním v přebytku bezvodého methanolu v přítomnosti BF_3 jako katalyzátoru.

Přístroje a pomůcky:

Destilační baňka s kulatým dnem, zpětný chladič, topné hnízdo, pipeta 5 a 20 ml, vialka 2 a 4 ml.

Chemikálie:

Bortrifluorid methanolický roztok 10%, isooktan p.a., chlorid sodný p.a. (nasycený vodný roztok), síran sodný bezvodý p.a.

Postup:

Do destilační baňky s vyextrahovaným tukem bylo přidáno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a varný kamínek. K baňce byl připojen zpětný chladič, byla vložena do topného hnízda a obsah byl přiveden k varu. Do směsi byly přidány přesně po 3 minutách varu přes horní konec chladiče 3 ml isooktanu, destilační baňka byla vyjmuta z topného hnízda a var byl zastaven.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Okamžitě po zastavení varu bylo do směsi přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka byla uzavřena a protřepávána 15 sekund. Poté bylo přidáno větší množství nasyceného vodného roztoku chloridu sodného tak, že hladina kapaliny dosáhla hrdla baňky a byl jasný přechod mezi dvěma fázemi. Baňka byla pro oddělení fází nechána 5 minut stát.

Z horní isooktanové vrstvy byly odebrány 2 ml do 4 ml vialky, bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml do vialky pro analýzu na plynovém chromatografu.

Koncentrace methylesteru mastné kyseliny v extraktu ve vialce se vypočítá pomocí vzorce:

$$c_{\text{MeMK}} = \frac{c_s \cdot P_{\text{MeMK}}}{P_s} \quad (3.3)$$

c_{MeMK}	koncentrace MeMK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
P_{MeMK}	plocha píku MeMK v extraktu [$\text{mV} \cdot \text{s}$]
c_s	koncentrace standardu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
P_s	plocha píku standardu [$\text{mV} \cdot \text{s}$]

Potřebné koncentrace, plochy píků a M_r standardů jsou uvedeny v tabulce 3.2.

Výpočet koncentrace MK přepočtem z koncentrace methylesteru MK:

$$c_{\text{MK}} = \frac{c_{\text{MeMK}} \cdot M_{r_{\text{MK}}}}{M_{r_{\text{MeMK}}}} \quad (3.4)$$

c_{MK}	koncentrace MK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
c_{MeMK}	koncentrace MeMK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
$M_{r_{\text{MK}}}$	molární hmotnosti MK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
$M_{r_{\text{MeMK}}}$	molární hmotnosti MeMK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

3.4. POUŽITÉ METODY A EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

Tabulka 3.2 Standardy MeMK používané pro identifikaci a kvantifikaci (koncentrace, plochy píků a molární hmotnosti)

Vzorec MeMK	MeMK	Retenční čas [min]	Koncentrace [mg·ml ⁻¹]	Plocha píku [mV·s]	Mr _{MeMK} [g·mol ⁻¹]	Mr _{MK} [g·mol ⁻¹]
C6:0	kapronová	5,74	0,04	2767172	130,187	116,16
C8:0	kaprylová	6,87	0,04	3310175	158,241	144,214
C10:0	kaprinová	8,01	0,04	3760655	186,295	172,268
C11:0	undekanová	8,64	0,02	1968818	200,322	186,295
C12:0	laurová	9,37	0,04	4302041	214,349	200,322
C13:0	tridekanová	10,2	0,02	2181950	228,376	214,349
C14:0	myristová	11,19	0,04	4575751	242,403	228,376
C14:1	myristoolejová	11,67	0,02	2214617	240,387	226,36
C15:0	pentadekanová	12,35	0,02	2288453	256,43	242,403
C15:1	pentadecenová	12,92	0,02	2262521	254,414	240,387
C16:0	palmitová	13,72	0,06	7158423	270,457	256,43
C16:1	palmitoolejová	14,19	0,02	2322445	268,441	254,414
C17:0	heptadekanová	15,25	0,02	1589265	284,484	270,457
C17:1	heptadecenová	15,79	0,02	2356498	282,468	268,441
C18:0	stearová	16,99	0,04	4825867	298,511	284,484
C18:1	olejová	17,47	0,04	7231723	296,495	282,468
C18:2	linolová	18,46	0,02	4293902	294,479	280,452
C18:3n6	gama-linolenová	19,21	0,02	2200645	292,463	278,436
C18:3n3	linolenová	20,02	0,02	2177651	292,463	278,436
C20:0	arachová	21,56	0,04	4870180	326,565	312,538
C20:1	eicosenová	22,3	0,02	2405373	322,533	308,506
C20:2	eicosadienová	23,93	0,02	2275580	322,533	308,506
C21:0	heneicosanová	24,8	0,02	2396746	340,592	326,565
C20:3n6	eicosatrienová 6	25,02	0,02	2033416	320,517	306,49
C20:3n3	eicosatrienová 3	25,99	0,02	2092644	316,485	302,458
C20:4	arachidonová	26,47	0,02	1697510	318,501	304,474
C20:5aC22:0	behenová	28,96	0,04	6480041	354,619	340,592
C22:1	eruková	30,16	0,02	2374777	352,603	338,576
C22:2	docosadienová	32,9	0,02	2031932	350,587	336,56
C23:0	trikosanová	34,29	0,02	2228815	368,646	354,619
C24:0	lignocerová	41,21	0,04	4166992	382,673	368,646
C24:1	nervonová	43,29	0,02	1937341	380,657	366,63
C22:6	docosaheptaenová	43,79	0,02	1553663	342,523	328,496

Výpočet množství v původním objemu v baňce:

$$m_{MK} = c_{MK} \cdot V \quad (3.5)$$

m_{MK}	celková hmotnost MK v baňce [mg]
c_{MK}	koncentrace MK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]
V	objem isooktanu (3ml)

Výpočet koncentrace MK v sýru:

$$c_{sýr} = \frac{m_{MK}}{m_{sýr}} \quad (3.6)$$

$c_{sýr}$	koncentrace MK v sýru [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]
m_{MK}	celková hmotnost MK v baňce [mg]
$m_{sýr}$	navážka vzorku sýra [g]

Výpočet koncentrace MK v tuku:

$$c_{tuk} = \frac{m_{MK}}{m_{tuk}} \quad (3.7)$$

c_{tuk}	koncentrace MK v tuku [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]
m_{MK}	celková hmotnost MK v baňce [mg]
m_{tuk}	hmotnost vyextrahovaného tuku ze vzorku [g]

3.4.3. Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf, TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie)
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona, DB-WAX (30 m \times 0,32 mm \times 0,5 μm)
- Oven – teplotní program
 - 50 °C, 1 minuta
 - Vzestupný gradient 25 °C \cdot min⁻¹ do 200 °C se zdržením 0 minut
 - Vzestupný gradient 3 °C \cdot min⁻¹ do 230 °C se zdržením 30 minut
 - Celková doba analýzy: 47 minut
- Inlet
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Splitless time: 1 minuta
 - Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) (1 μl)
- Carrier gas
 - Průtok dusíku: 1 ml \cdot min⁻¹
- Detektor FID (plamenově ionizační)
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Průtok vzduchu: 350 ml \cdot min⁻¹
 - Průtok vodíku: 35 ml \cdot min⁻¹
 - Make-up dusíku: 30 ml \cdot min⁻¹

3.5. Statistické vyhodnocení výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2016. Každý vzorek byl analyzován zvlášť pro stanovení všech a volných mastných kyselin, měření bylo provedeno vždy dvakrát ($n = 2$).

Výsledky jsou vyjádřeny v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra ve tvaru *průměr* \pm *směrodatná odchylka*.

Statistická významnost rozdílů mezi vzorky byla vyhodnocena pomocí dvouvýběrového párového t-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ viz tabulky [4.2](#) a [4.4](#).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce je součástí rozsáhlé studie, která se zabývá sledováním senzorické kvality přírodních sýrů eidamského typu, se zaměřením především na chutnost (flavour). Hlavní pozornost je věnována lipidům a mastným kyselinám jako významným prekursorům chuti/aroma sýrů.

V rámci této práce bylo analyzováno pět modelových vzorků eidamských sýrů vyrobených s použitím různých mikrobiálních startovacích kultur; konkrétně klasická mezofilní (smetanová) kultura a vybrané kmeny termofilních bakterií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Práce probíhala ve spolupráci s Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně, modelové vzorky byly vyrobeny standardním technologickým postupem (viz kapitola 2.5.1) a analyzovány v počáteční fázi zrání (14 dní po výrobě).

Podstatou bylo posouzení vlivu různých mikrobiálních kultur na obsah volných/vázaných mastných kyselin ve vzorcích. Pro stanovení mastných kyselin byla aplikována izolace lipidů ze vzorků směsí rozpouštědel (diethylether, petrolether), následná esterifikace za použití bortrifluoridu jako katalyzátoru a konečná analýza GC-FID (viz kapitola 3.3).

4.1. Identifikace a kvantifikace MK ve vzorcích sýra

Mastné kyseliny ve vzorcích sýrů byly identifikovány a kvantifikovány pomocí retenčních charakteristik identických standardů (viz tabulka 3.1). Ve vzorcích bylo celkem identifikováno 17 MK. V tabulkách 4.1 a 4.3 je uveden komplexní přehled identifikovaných volných a vázaných MK, výsledky jsou vyjádřeny v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra. Ukázky výsledných chromatogramů jsou uvedeny v přílohách 1 - 5 na str. 55 - 63.

4.2. Srovnání obsahu vázaných MK ve vzorcích sýra

Ve všech vzorcích bylo identifikováno 17 masných kyselin, rozdíly nastaly až při jejich kvantifikaci.

Na obrázku 4.1 je zobrazeno srovnání obsahu vybraných mastných kyselin nacházejících se ve vzorcích sýrů; vybrány byly vzhledem k jejich vysokému zastoupení ve vzorcích.

Vzorek D, vyrobený pouze s použitím mezofilní kultury, byl použit jako srovnávací vzorek. Na obrázku 4.1 můžeme vidět, že obsah vázaných mastných kyselin u vzorků vyrobených s termofilní kulturou je nižší, než u vzorku D. Bude to způsobeno nejspíše tím, že termofilní kultura vykazuje vyšší lipolytickou aktivitu a má tak větší vliv právě na vázané mastné kyseliny a jejich odbourávání je rychlejší. U vzorků G a J, stejně jako u vzorků H a I, lze předpokládat, že obsah mastných kyselin bude velmi podobný. V případě vzorků G a J se tento předpoklad potvrdil - obě termofilní kultury, které obsahovaly kmeny *Lactobacillus casei* mají na odbourávání vázaných mastných kyselin stejný vliv. V případě vzorků H a I byl mezi vzorky detekován větší rozdíl. Z toho vyplývá, že termofilní kultura, která obsahuje *Lactobacillus plantarum* (kmen CCDM 187) a která byla použita pro výrobu

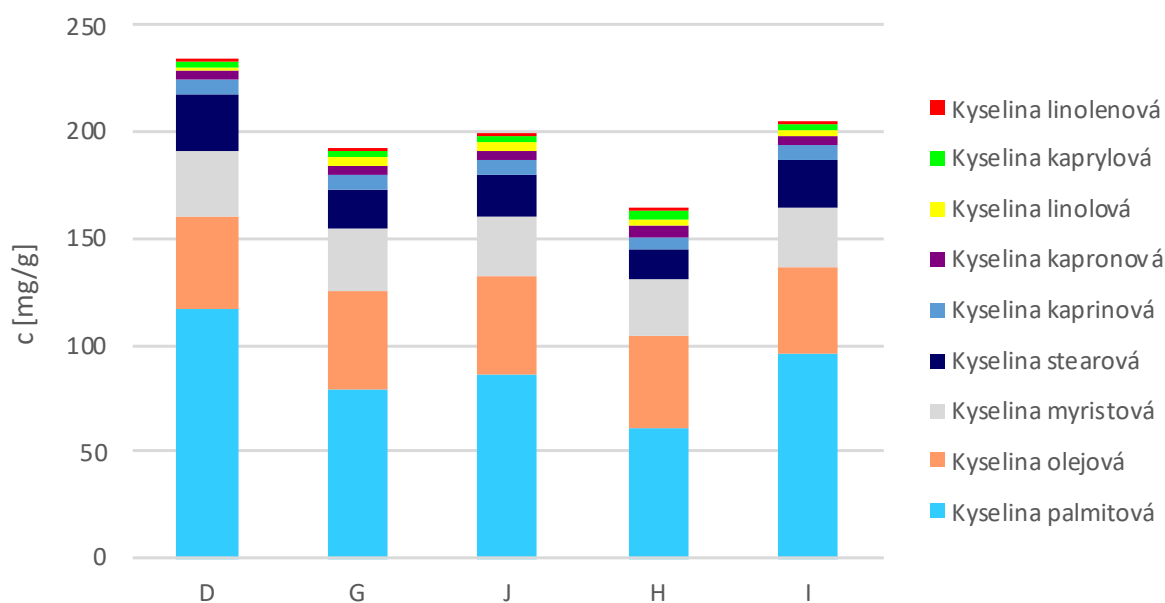
4.2. SROVNÁNÍ OBSAHU VÁZANÝCH MK VE VZORCÍCH SÝRA

vzorku H má vliv na rychlejší odbourávání vázaných mastných kyselin. *Lactobacillus plantarum* (kmen CCDM 189) vykazovala podobnou lipolytickou aktivitu jako oba kmeny *Lactobacillus casei*. Na základě statistického zpracování (viz tabulka 4.2) však rozdíly nejsou statisticky významné ($p < 0,05$).

U všech vzorků byly nejvíce obsaženy kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová. Koncentrace ostatních mastných kyselin byla pod $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Tabulka 4.1 Obsah vázaných mastných kyselin v sýru (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

Název MK	Obsah v sýru [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]				
	D	G	J	H	I
K. kapronová	$4,52 \pm 0,89$	$4,16 \pm 0,58$	$4,36 \pm 0,66$	$4,59 \pm 0,87$	$4,32 \pm 0,78$
K. kaprylová	$3,07 \pm 0,65$	$2,87 \pm 0,50$	$2,77 \pm 0,58$	$2,99 \pm 0,68$	$2,81 \pm 0,51$
K. kaprinová	$6,86 \pm 1,05$	$6,98 \pm 1,06$	$6,52 \pm 1,16$	$6,82 \pm 1,10$	$6,58 \pm 0,92$
K. undekanová	$0,22 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,03$
K. laurová	$8,20 \pm 1,16$	$8,53 \pm 1,29$	$7,93 \pm 1,40$	$8,09 \pm 1,09$	$7,90 \pm 0,97$
K. tridekanová	$0,38 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,11$	$0,46 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,05$
K. myristová	$31,38 \pm 6,81$	$30,31 \pm 5,43$	$28,59 \pm 6,14$	$27,24 \pm 3,89$	$28,21 \pm 4,66$
K. myristoolejová	$1,63 \pm 0,97$	$2,89 \pm 0,36$	$2,77 \pm 0,49$	$2,94 \pm 0,46$	$2,92 \pm 0,29$
K. pentadekanová	$1,52 \pm 1,28$	$1,60 \pm 1,14$	$4,55 \pm 1,35$	$3,80 \pm 0,71$	$4,45 \pm 1,34$
K. pentadecenová	$0,65 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,06$	$0,47 \pm 0,03$
K. palmitová	$116,75 \pm 74,36$	$79,45 \pm 42,43$	$86,81 \pm 44,77$	$61,12 \pm 24,16$	$96,10 \pm 57,01$
K. palmitoolejová	$3,62 \pm 2,22$	$3,64 \pm 2,29$	$6,62 \pm 0,98$	$7,21 \pm 1,26$	$6,30 \pm 0,39$
K. heptadekanová	$3,41 \pm 2,02$	$2,46 \pm 1,14$	$2,86 \pm 1,38$	$1,76 \pm 0,62$	$2,78 \pm 1,61$
K. stearová	$25,90 \pm 17,62$	$18,49 \pm 10,63$	$19,65 \pm 11,44$	$12,79 \pm 5,89$	$21,88 \pm 14,22$
K. olejová	$43,13 \pm 5,77$	$45,33 \pm 6,72$	$44,87 \pm 9,36$	$43,16 \pm 4,81$	$40,47 \pm 4,44$
K. linolová	$1,57 \pm 1,49$	$3,46 \pm 0,37$	$3,96 \pm 0,93$	$3,78 \pm 0,50$	$3,72 \pm 0,61$
K. linolenová	$1,19 \pm 0,17$	$1,32 \pm 0,28$	$1,17 \pm 0,11$	$1,20 \pm 0,11$	$0,99 \pm 0,07$



Obrázek 4.1 Obsah vybraných vázaných mastných kyselin v sýru

Tabulka 4.2 Studentův t-test pro vázané mastné kyseliny (N – není rozdíl)

	D	G	J	H	I
D	–	–	–	–	–
G	N	–	–	–	–
J	N	N	–	–	–
H	N	N	N	–	–
I	N	N	N	N	–

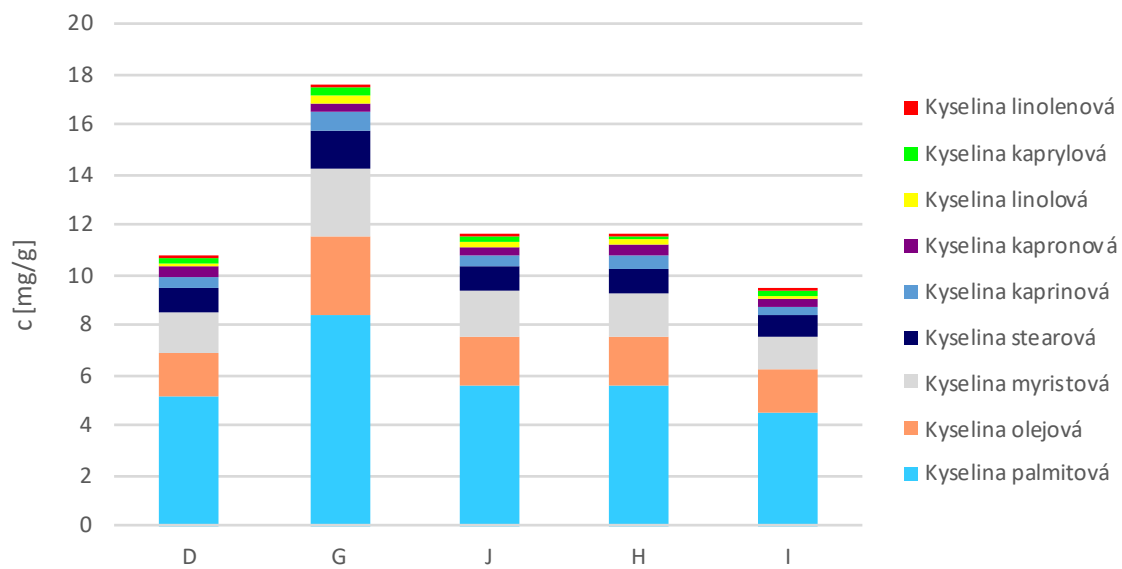
4.3. Srovnání obsahu VMK ve vzorcích

Na obrázku 4.2 je zobrazeno srovnání obsahu vybraných volných mastných kyselin nacházejících se ve vzorcích sýrů. I v tomto případě byl vzorek D použit jako vzorek srovnávací. Na obrázku 4.2 můžeme vidět, že s výjimkou vzorku G je obsah volných mastných kyselin ve vzorcích velmi podobný. Vzhledem k vlivu termofilní kultury na rychlost odbourávání vázaných mastných kyselin byl očekáván vyšší obsah volných mastných kyselin ve vzorcích, u kterých byla tato kultura použita. Toto očekávání se vyplnilo pouze u vzorku G. Vysvětlením této skutečnosti může být pokračující degradace volných mastných kyselin na aromaticky aktivní látky, které se nejspíše projevilo právě u vzorků J, H a I. Největší vliv měl tento rozpad na vzorek I, ve kterém je obsah volných mastných kyselin nižší, než u vzorku D. U všech vzorků byly opět v nejhojnějším počtu obsaženy kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová. Obsah ostatních mastných kyselin byl ve většině případů menší než $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Na základě statistického zpracování (viz tabulka 4.4) však rozdíly nejsou statisticky významné ($p < 0,05$).

Tabulka 4.3 Obsah volných mastných kyselin v sýru (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

Název MK	Obsah v sýru [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]				
	D	G	J	H	I
K. kapronová	$0,38 \pm 0,16$	$0,42 \pm 0,13$	$0,33 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,09$	$0,27 \pm 0,02$
K. kaprylová	$0,23 \pm 0,10$	$0,29 \pm 0,11$	$0,21 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,01$
K. kaprinová	$0,47 \pm 0,19$	$0,69 \pm 0,32$	$0,46 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,13$	$0,34 \pm 0,01$
K. undekanová	$0,01 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
K. laurová	$0,52 \pm 0,018$	$0,82 \pm 0,40$	$0,54 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,12$	$0,40 \pm 0,01$
K. tridekanová	$0,02 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
K. myristová	$1,68 \pm 0,57$	$2,69 \pm 1,29$	$1,79 \pm 0,18$	$1,72 \pm 0,33$	$1,33 \pm 0,01$
K. myristoolejová	$0,18 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,19$	$0,18 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,01$
K. pentadekanová	$0,11 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,01$
K. pentadecenová	$0,03 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
K. palmitová	$5,17 \pm 1,63$	$8,41 \pm 3,99$	$5,61 \pm 0,55$	$5,53 \pm 1,03$	$4,49 \pm 0,39$
K. palmitoolejová	$0,37 \pm 0,10$	$0,77 \pm 0,43$	$0,44 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,18$	$1,12 \pm 0,79$
K. heptadekanová	$0,12 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,12$	$0,15 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
K. stearová	$0,91 \pm 0,26$	$1,57 \pm 0,71$	$0,93 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,17$	$0,87 \pm 0,13$
K. olejová	$1,68 \pm 0,46$	$3,10 \pm 1,39$	$1,96 \pm 0,08$	$1,96 \pm 0,24$	$1,72 \pm 0,19$
K. linolová	$0,18 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,11$	$0,20 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,01$
K. linolenová	$0,07 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$

4.3. SROVNÁNÍ OBSAHU VMK VE VZORCÍCH



Obrázek 4.2 Obsah vybraných volných mastných kyselin v sýru

Tabulka 4.4 Studentův t-test pro volné mastné kyseliny (N – není rozdíl)

	D	G	J	H	I
D	–	–	–	–	–
G	N	–	–	–	–
J	N	N	–	–	–
H	N	N	N	–	–
I	N	N	N	N	–

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo identifikovat a kvantifikovat volné a vázané mastné kyseliny ve vzorcích eidamských sýrů, vyrobených na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Vzorky byly vyrobeny standardním postupem v 5 sériích; série se lišily kombinací mikrobiálních kultur. Pro všechny série byla použita mezofilní kultura s přídavkem kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Pro čtyři z pěti sérií byla navíc použita termofilní kultura, vždy dva vybrané kmeny *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Celkem bylo analyzováno pět vzorků, jejichž doba zrání byla 14 dní.

Izolace lipidů byla provedena extrakcí s použitím směsi rozpouštědel (diethylether a petrolether) podle ČSN EN ISO 1735:2005. Následně byly mastné kyseliny převedeny na těkavé methylestery kyselou esterifikací methanolickým roztokem bortrifluoridu, stanovení MK bylo provedeno za použití plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem.

Celkem bylo ve všech vzorcích identifikováno 17 mastných kyselin, rozdíly se týkaly jejich obsahu ve vzorcích. Nejvyšší zastoupení ve všech vzorcích měly kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová. Mastné kyseliny jsou základní složkou lipidů; v mléčném tuku se nachází především vázané mastné kyseliny, volné jsou přítomny jen v malém množství. Obsah volných mastných kyselin byl podle očekávání několikanásobně nižší než vázaných.

Výsledky vedou k závěru, že použitá mikrobiální kultura má vliv na obsah mastných kyselin v sýru, výsledky jsou však nejednoznačné. Ve vzorcích vyrobených za přídavku termofilní kultury klesl obsah vázaných mastných kyselin, pravděpodobně kvůli vyšší lipolytické aktivitě, obsah volných mastných kyselin se ve většině případů téměř nezměnil. Tuto skutečnost lze připsat jejich degradaci za vzniku řady dalších nízkouhlíkatých sloučenin. Také je třeba brát v úvahu fakt, že vzorky byly v podstatě na počátku zrání (14 dní od výroby), a během zrání tak pravděpodobně dojde k dalším výrazným změnám ve složení.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SIMEONOVÁ, Jana, Ivo INGR a Stanislav GAJDUŠEK, 2003. Zpracování a zboží živočišných produktů. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7708-1.
- [2] JANŠTOVÁ, Bohumíra, Lenka VORLOVÁ, Pavlína NAVRÁTILOVÁ, Michaela KRÁLOVÁ, Lenka NECIDOVÁ a Eva MAŘICOVÁ, 2012. Technologie mléka a mléčných výrobků. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-635-3.
- [3] JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ, 2014. Produkce mléka a technologie mléčných výrobků. Brno: VFU Brno. ISBN 978-80-7305-712-1.
- [4] GAJDUŠEK, Stanislav, 2003. Laktologie. ISBN 80-7157-657-3.
- [5] NAVRÁTILOVÁ, Pavlína, Michaela KRÁLOVÁ (DRAČKOVÁ), Bohumíra JANŠTOVÁ, Hana PŘIDALOVÁ, Šárka CUPÁKOVÁ a Lenka VORLOVÁ, 2012. Hygiena produkce mléka. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-624-7.
- [6] ZADRAŽIL, Karel, 2002. Mlékařství: (přednášky). Praha: ISV. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-866-4215-1.
- [7] BUŇKA, František, Vendula PACHLOVÁ, Leona BUŇKOVÁ a Michaela ČERNÍKOVÁ, 2013. Mlékárenské technologie I. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [8] Vyhláška č. 397/2016 Sb.: Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: Sbírka zákonů ČR. ročník 2016, 162/2016.
- [9] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH, 2012. Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [10] DRDÁK, Milan, 1996. Základy potravinářských technologií spracovanie rastlinných a živočišných surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín. Bratislava: Malé centrum. ISBN 80-967064-1-1.
- [11] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK, 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. Bratislava: Malé centrum. ISBN 80-967064-9-7.
- [12] IBURG, Anne, 2004. Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť. Čestlice: Rebo Productions CZ. ISBN 80-7234-379-3.
- [13] CALLEC, Christian, 2002. Encyklopedie sýrů. Čestlice: Rebo Productions CZ. ISBN 80-7234-225-8.
- [14] ČSN EN ISO 5534. Sýry eidamského typu (s různým obsahem tuku a sušiny), 2017. Praha: Sekce pro mléko Potravinářské komory České republiky.

- [15] RIDGWAY, Judy, 2004. Sýry: průvodce světem sýrů. druhé vydá. Praha: Fortuna Print. ISBN 80-7321-108-4.
- [16] Sýry: druhy a recepty, 2006. V Praze: Ikar. ISBN 80-249-0756-9.
- [17] MATHEWS, Christopher K., K.E. VAN HOLDE, Dean R. APPLING a Spencer J. ANTHONY-CAHILL, c2013. Biochemistry. 4th ed. Toronto: Pearson. ISBN 978-0-13-800464-4.
- [18] FERRIER, Denise R., c2014. Lippincott´s illustrated reviews: biochemistry. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. ISBN 978-1-4511-8753-3.
- [19] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. Chemie potravin I. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [20] ČERNÁ, Marie, 1979. Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků. Praha: STI.
- [21] PAVELKA, Antonín, 1996. Mléčné výrobky pro vaše zdraví. Brno: Litera. ISBN 80-857-6309-5.
- [22] KERESTEŠ, Ján, 2016. Mlieko vo výžive ľudí. Bratislava: CAD Press. ISBN 978-80-88969-72-3.
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk, 2007. Biochemie. 2. oprav. vyd. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [24] HELÁN, Václav, ed., 2005. Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu. 2. upravené vydání. Český Těšín: 2 THETA. ISBN 80-86380-29-7.
- [25] CHRISTIAN, Gary D., Purnendu K. DASGUPTA a Kevin A. SCHUG, c2014. Analytical chemistry. 7th ed. Hoboken: Wiley. ISBN 978-0-470-88757-8.
- [26] ZÁRUBA, Kamil, 2016. Analytická chemie (1.díl). Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [27] KLOUDA, Pavel, 2003. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-86369-07-2.
- [28] CHURÁČEK, Jaroslav, 1990. Analytická separace látek. Praha: SNTL. ISBN 80-03-00569-8.
- [29] KŘÍŽEK, Martin a Jan ŠÍMA, 2015. Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-486-5.
- [30] POOLE, Colin, 2012. Gas chromatography. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-0-12-385540-4.
- [31] SCHOMBURG, Gerhard, c1990. Gas chromatography: a practical course. New York: VCH. ISBN 0-89573-889-9.
- [32] KOVAL, D. Výběr a optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

SEZNAM OBRÁZKŮ

2.1	Schéma výroby sýrů	21
2.2	Schéma výroby sýrů eidamského typu	23
2.3	Schéma plynového chromatografu	28
3.1	Extrakce lipidů, oddělené fáze	33
3.2	Esterifikace s bortrifluoridem	35
3.3	Destilační baňka s roztokem s oddělenými fázemi	35
3.4	Vialka se vzorkem připravená na analýzu GC-FID	36
4.1	Obsah vybraných vázaných mastných kyselin v sýru	42
4.2	Obsah vybraných volných mastných kyselin v sýru	44

SEZNAM TABULEK

2.1	Podrobné rozdělení složek mléka	14
2.2	Zastoupení jednotlivých frakcí mléčného tuku	24
2.3	Obsah lipidů v mléce různých savců	25
2.4	Nejdůležitější mastné kyseliny mléčného tuku	26
3.1	Přehled a označení vzorků	32
3.2	Standardy MeMK používané pro identifikaci a kvantifikaci	38
4.1	Obsah vázaných mastných kyselin v sýru	42
4.2	Studentův t-test pro vázané mastné kyseliny	43
4.3	Obsah volných mastných kyselin v sýru	43
4.4	Studentův t-test pro volné mastné kyseliny	44

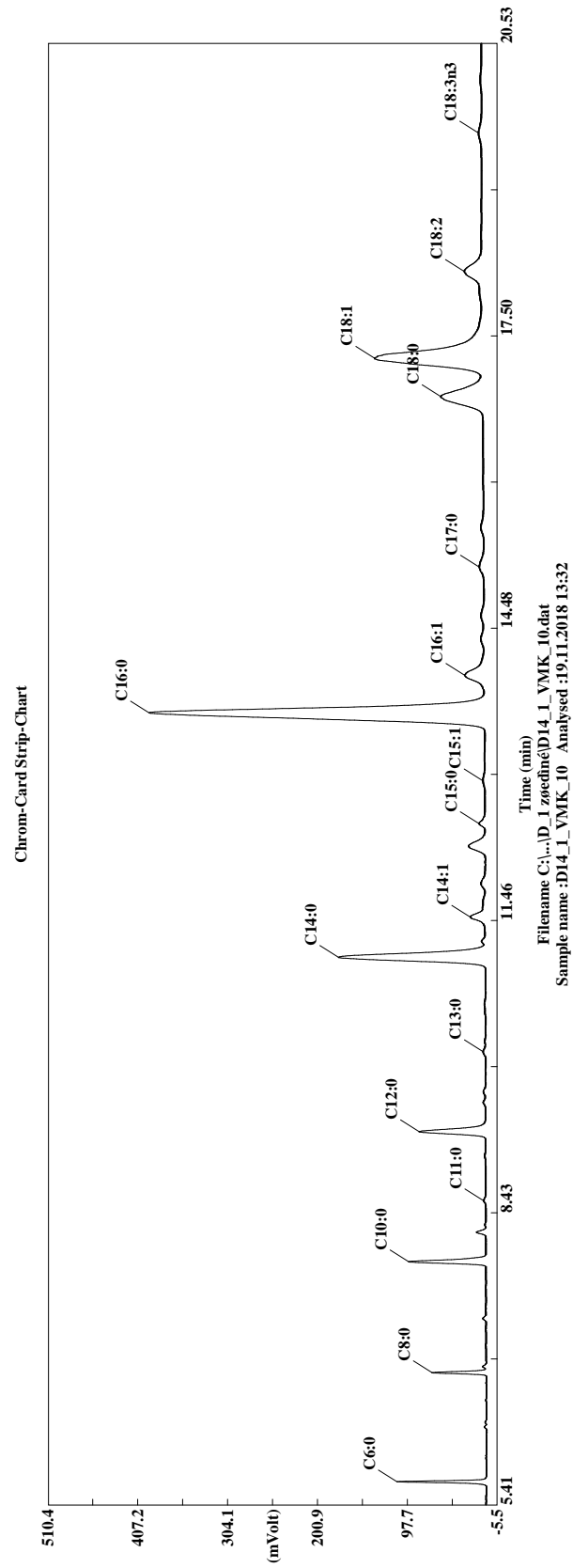
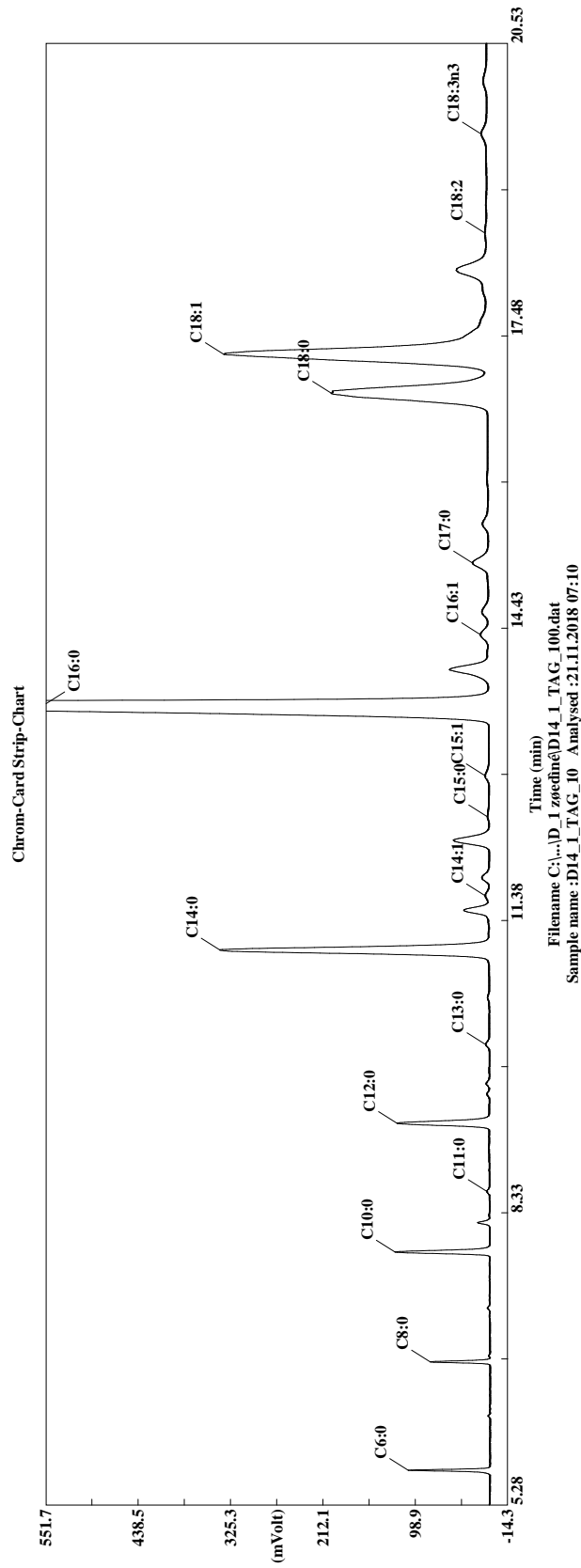
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
MeMK	methylestery mastných kyselin
MK	mastné kyseliny
TAG	triacylglyceroly
VMK	volné mastné kyseliny

SEZNAM PŘÍLOH

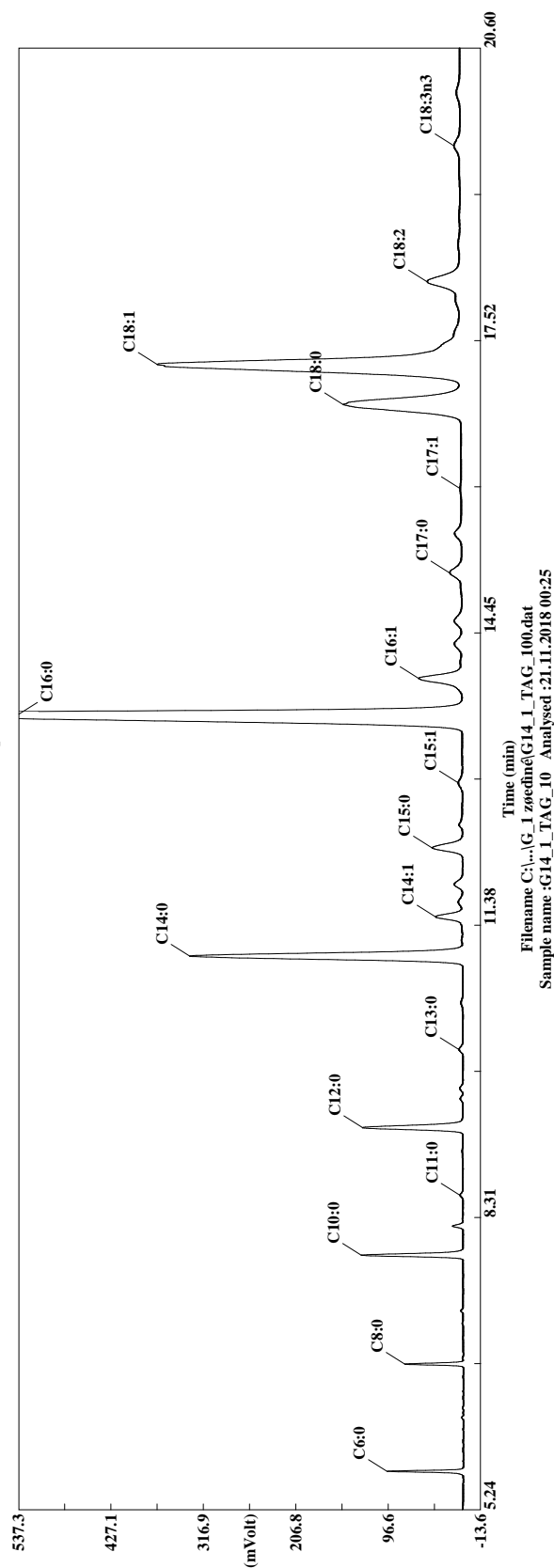
Chromatogram vzorku D	55
Chromatogram vzorku G	57
Chromatogram vzorku J	59
Chromatogram vzorku H	61
Chromatogram vzorku I	63

PŘÍLOHY

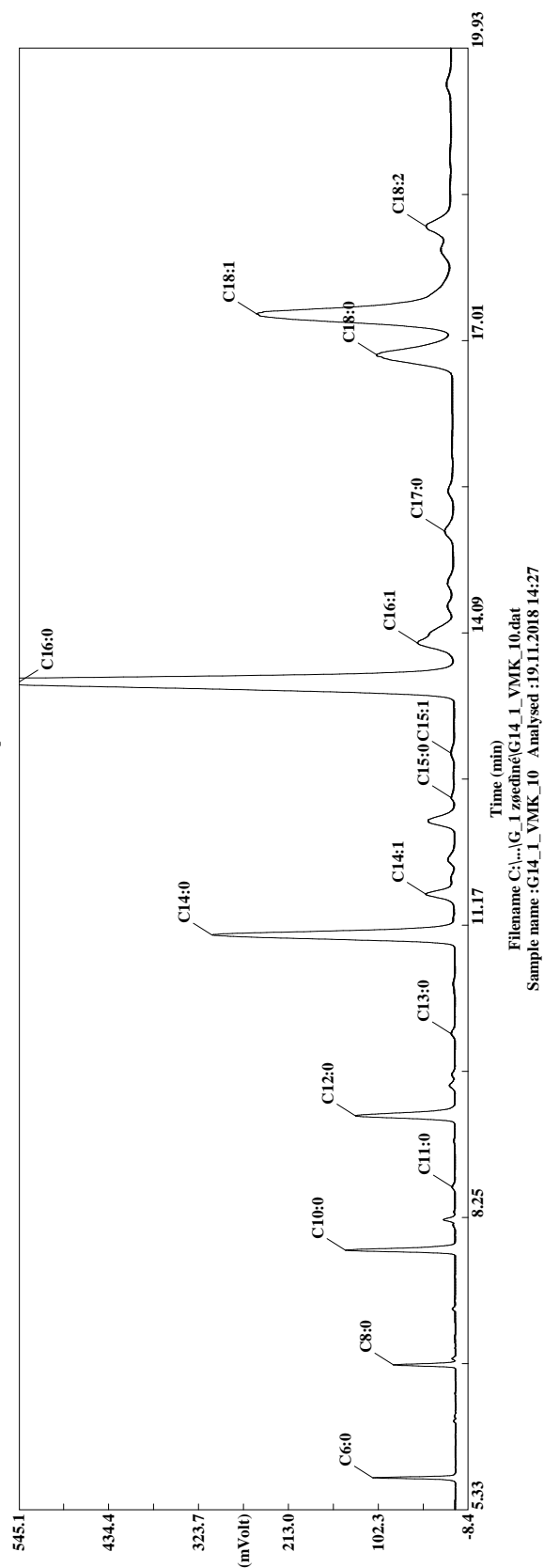


Příloha 1 Chromatogram vzorku D

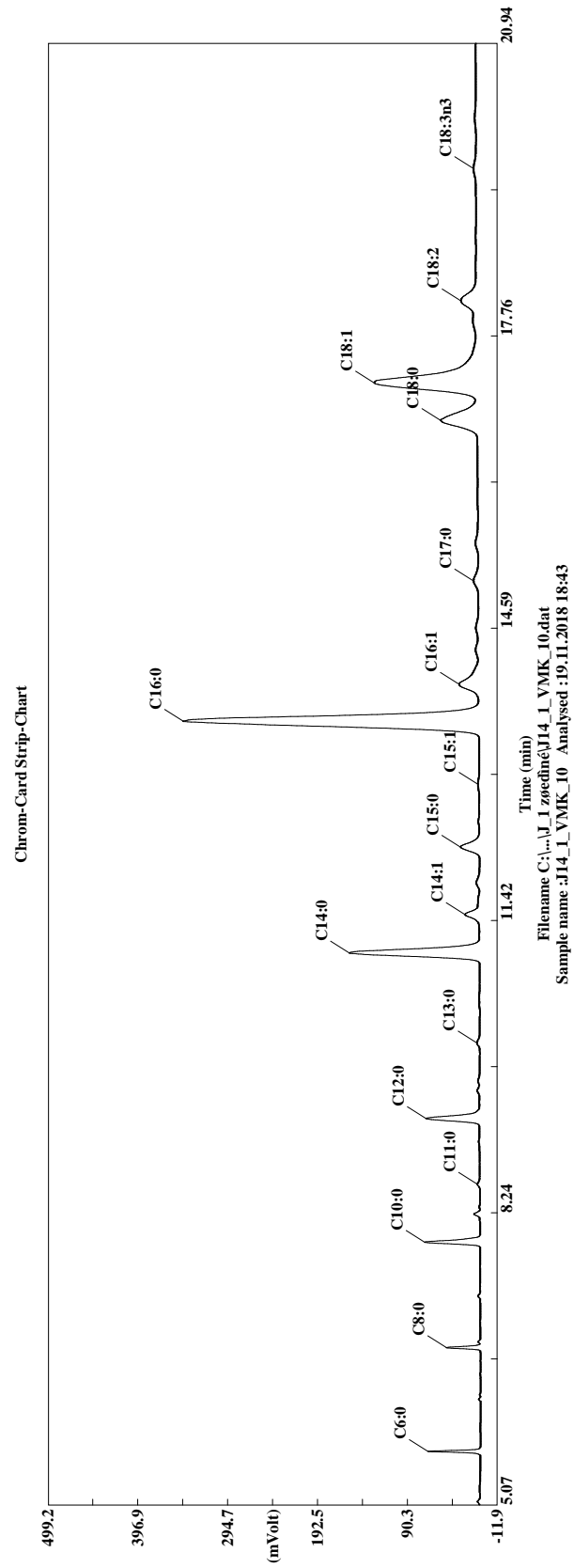
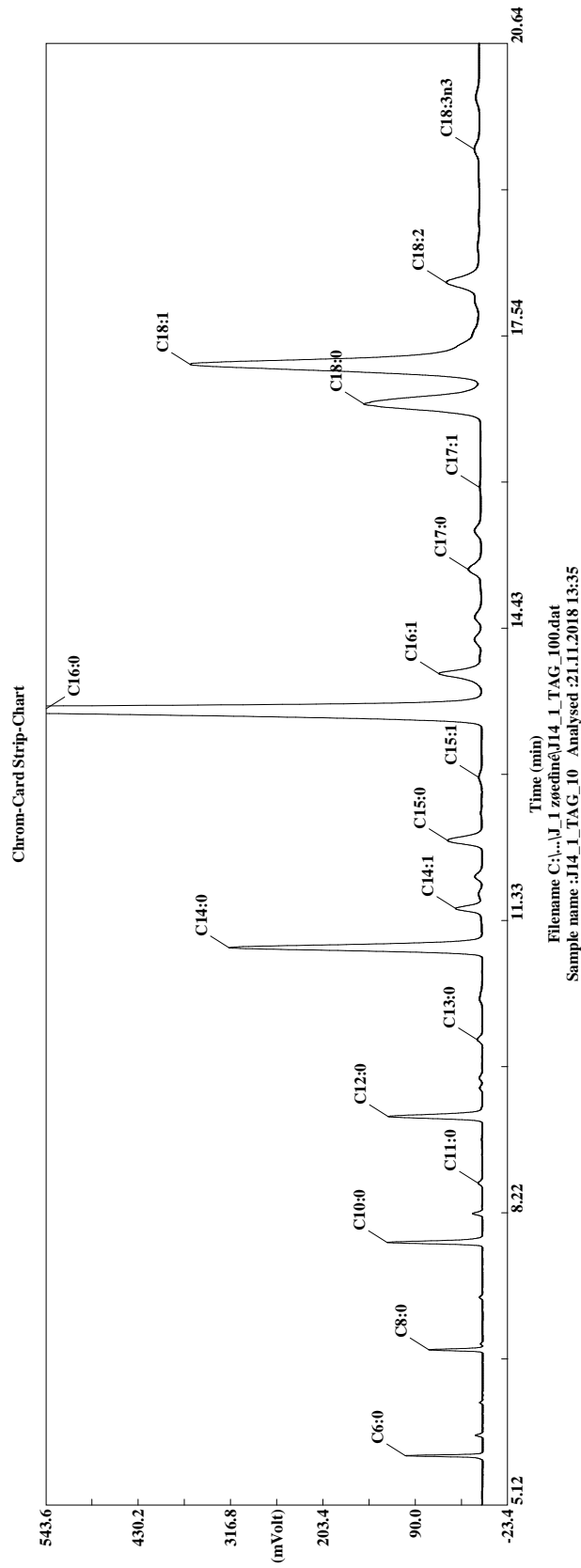
Chrom-Card Strip-Chart



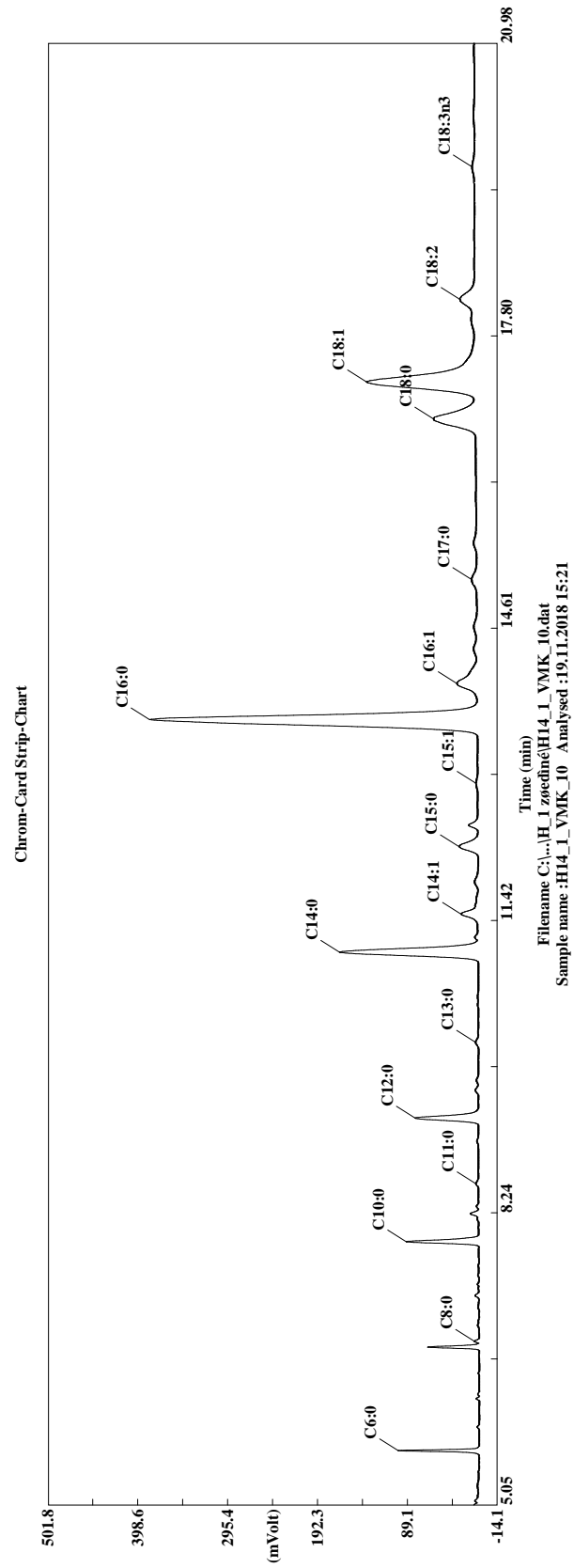
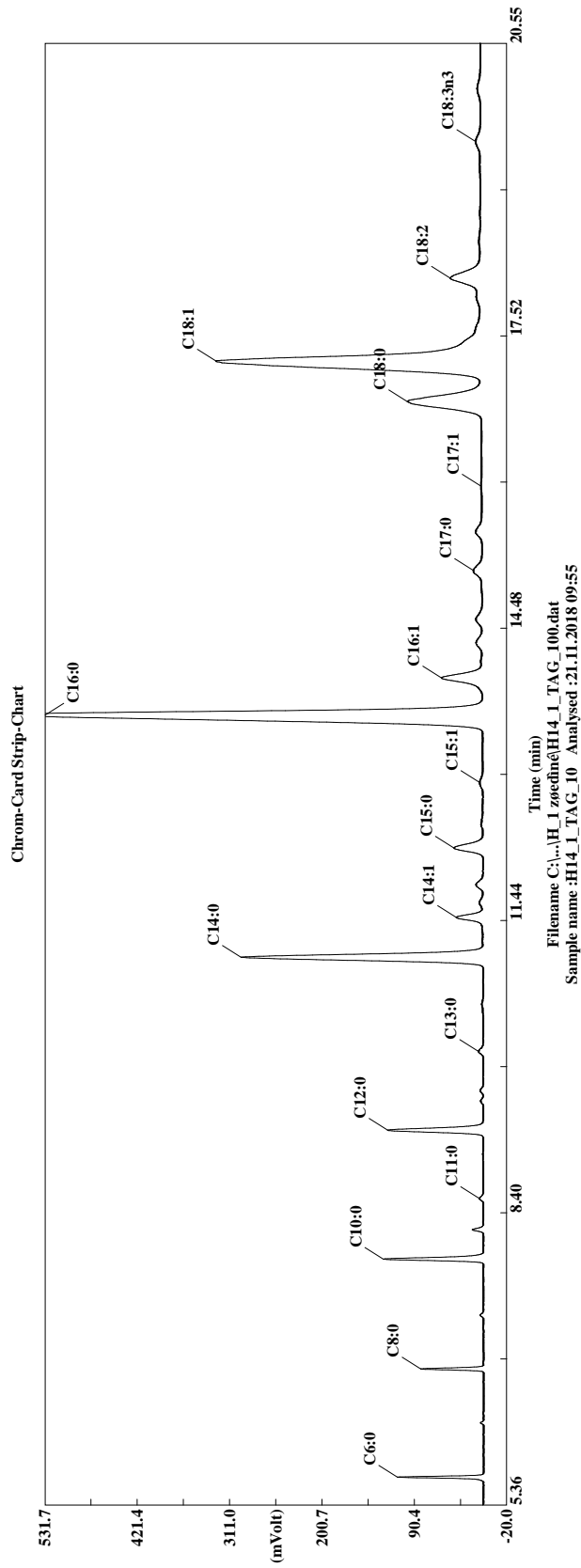
Chrom-Card Strip-Chart



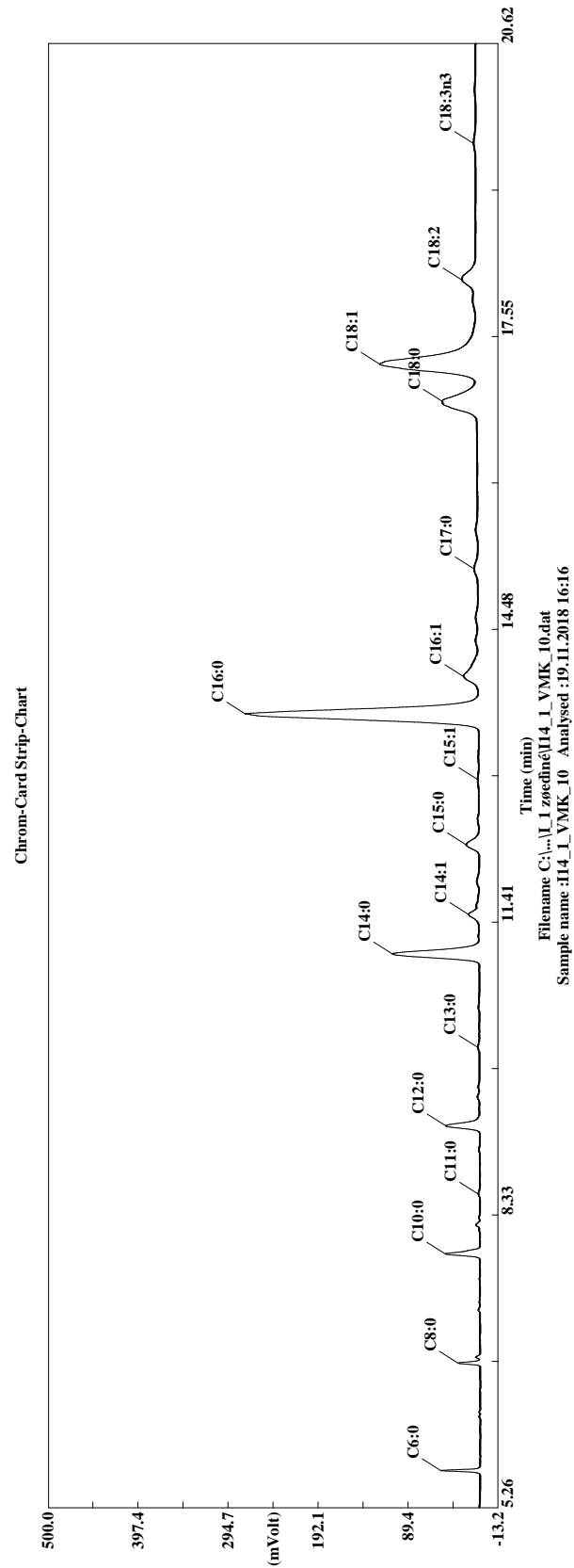
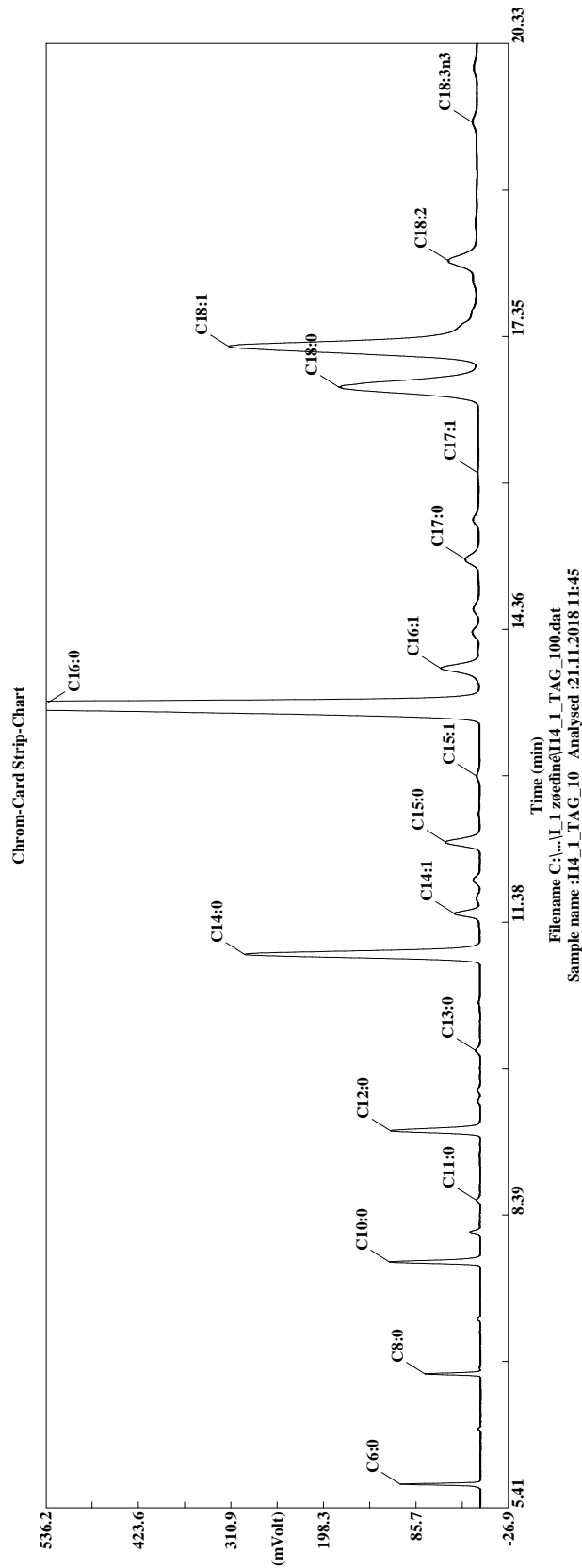
Příloha 2 Chromatogram vzorku G



Příloha 3 Chromatogram vzorku J



Příloha 4 Chromatogram vzorku H



Příloha 5 Chromatogram vzorku I